
Einflussfaktoren auf die Proliferation und die neuronale Differenzierung humaner mesenchymaler Knochenmarkszellen

Andreas Schlicker



München 2011

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. M. Dieterich

Einflussfaktoren auf die Proliferation und die neuronale Differenzierung humaner mesenchymaler Knochenmarkszellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andreas Schlicker
aus Schrobenhausen

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Straube

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Peter Müller
Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

07.07.2011

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	2
1.1. Der Prozess der Neurogenese	2
1.2. Regeneration und Zellersatz durch Stammzellen	2
1.2.1. Stammzelle - Definition	2
1.2.2. Embryonale versus adulte Stammzellen – Vor- und Nachteile	3
1.3. Mesenchymale Stromazellen	4
1.3.1. Definition	4
1.3.2. Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Knochenmarkszellen	5
1.3.3. Phänotypisierung mesenchymaler Knochenmarkszellen	7
1.3.4. Elektrophysiologische Eigenschaften mesenchymaler Knochenmarkszellen	8
1.3.5. Plastizität mesenchymaler Knochenmarkszellen	8
1.4. Klinische Relevanz	13
1.4.1. Erkenntnisse aus dem Tierversuch	13
1.4.2. Erkenntnisse beim Menschen	15
1.5. Zusammenfassung	16
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. Material	18
3.1.1. Geräte, Gebrauchsmaterialien und Software	18
3.1.2. Chemikalien	19
3.1.3. Gebrauchslösungen	19
3.1.4. Medien und Supplemente für die Zellkultur	19
3.1.5. Materialien für die Beschichtung	20
3.1.6. Materialien für die Immunfluoreszenz	20
3.2. Methoden	20
3.2.1. Zellkultur	20
3.2.2. Kulturmedien	22
3.2.3. Zellkultur-Supplemente	24
3.2.4. Beschichtung mit extrazellulärer Matrix	25
3.2.5. Induktion der neuronalen Differenzierung	27
3.2.6. Diagnostische Methoden	28
3.3. Statistik	31
3.3.1. Syntax des statistischen Modells	31
3.3.2. Fragestellungen der statistischen Datenanalyse	31
4. ERGEBNISSE	34
4.1. Lichtmikroskopische Auswertung	34
4.2. Globale Datenanalyse	36
4.3. Korrelation von Differenzierung und Proliferation	38

4.4. Einflussfaktoren neuronaler Differenzierung	40
4.4.1. Einfluss des Mediums	40
4.4.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren	41
4.4.3. Einfluss der Beschichtung	43
4.4.4. Einfluss des Serumanteils	45
4.4.5. Einfluss der Kombination der Faktoren im "Best-Off"-Protokoll	47
4.5. Einflussfaktoren von Proliferation	51
4.5.1. Einfluss des Mediums	51
4.5.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren	52
4.5.3. Einfluss der Beschichtung	53
4.5.4. Einfluss des Serumanteils	54
4.5.5. Einfluss der Kombination der Faktoren im "Best-Off"-Protokoll	56
4.6. Spezielle Fragestellungen	57
4.6.1. Effekte von Serum und Kulturmedium auf Differenzierung und Proliferation	57
4.6.2. Effekte des Wachstumsfaktors FGF-2 auf Differenzierung und Proliferation	60
4.6.3. Effekte der Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH und von Heparin	60
4.6.4. Zusätzliche Effekte extrazellulärer Matrixproteine	61
4.6.5. Effekte der Zellkulturzusätze B27 und N2	62
4.6.6. Effekte der Wachstumsfaktoren und von Beschichtung bei <i>minimal-serum-condition</i>	63
5. DISKUSSION	65
5.1. Diskussion der Methodik	66
5.1.1. Methodische Herausforderungen	66
5.1.2. Beurteilung des <i>in-vitro</i> -Modells für neuronale Differenzierung	68
5.1.3. Beurteilung der statistischen Methodik	71
5.2. Diskussion der Ergebnisse	72
5.2.1. Einfluss des Mediums und der Zellkulturzusätze B27 und N2	72
5.2.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren und von Heparin	73
5.2.3. Einfluss des Serumanteils	76
5.2.4. Einfluss der Beschichtung und des Trocknungsgrades	77
5.3. Ausblick	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	81
7. ANHANG	83
7.1. Abkürzungsverzeichnis	83
7.2. Abbildungsverzeichnis	85
7.3. Tabellenverzeichnis	86
8. LITERATURVERZEICHNIS	88
9. DANKSAGUNG	125
10. LEBENSLAUF	126

Vorwort

Erkrankungen und Schädigungen des zentralen Nervensystems können häufig nur unzureichend behandelt werden. Endogene Reparaturmechanismen und gegenwärtige therapeutische Massnahmen sind kaum imstande, den Verlust oder die Verletzung von Nervenzellen zu kompensieren. Mit Hilfe von Therapien, die auf Zellersatz basieren, hofft man, den oft schwerwiegenden Konsequenzen neurologischer Krankheitsbilder entgegenzutreten. Experimentelle Ansätze zum Ersatz glialer oder neuronaler Zellen basieren bislang vorwiegend auf der Verwendung embryonaler und fetaler Gewebe oder der Applikation neuronaler Stammzellen (Levy et al, 2004; Correia et al, 2005).

Es ist das Ergebnis vieler Forschungsarbeiten insbesondere des letzten Jahrzehnts, dass den adulten Stammzellen eine größere Plastizität zugeschrieben wird und man davon ausgeht, dass sie offenbar fähig sind ein weitaus grösseres Spektrum an Zelltypen hervorzubringen als bislang vermutet. Die Erkenntnisse aus dem Bereich der adulten Stammzellforschung haben die herkömmliche Sicht der Biologie von Stammzellen entscheidend verändert und nähren die Hoffnung, dass die Verwendung autologer adulter Stammzellen die Therapie zahlreicher Erkrankungen revolutionieren kann. Als besonders aussichtsreiche Kandidaten dafür gelten mesenchymale Zellen des Knochenmarks.

Die Erforschung der Nutzbarkeit dieser spezifischen Stammzellpopulation ist daher von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuartiger Therapieansätze neurodegenerativer Erkrankungen.

1. Einleitung

1.1. Der Prozess der Neurogenese

Die Entwicklung des Nervensystems und seiner zellulären Komponenten ist ein stufenweiser, hoch regulierter Prozess, der über die Vorstufe multipotenter Vorläuferzellen in die Ausreifung differenzierter Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten mündet. Die an diesem komplexen Prozess beteiligten Faktoren werden seit Jahrzehnten intensiv erforscht.

Die neuronale Differenzierung geht mit der Expressionsänderung Zellzyklus-assoziiierter Gene und der Zunahme neuraler Transkriptionsfaktoren einher. Eine zentrale Rolle spielt dabei das antiproliferative Gen PC3, das mit der Geburtsstunde der Nervenzelle in Verbindung gebracht wurde (Iacopetti et al, 1994). Die Überexpression von PC3 führt zur Expression der häufig als „neuronale Marker“ bezeichneten Proteine β -III-Tubulin und MAP-2 (Canzoniere et al, 2004). Für das Überleben und die Reifung werdender Neurone üben endogen produzierte Wachstumsfaktoren eine wichtige Funktion aus. Eine ebenso bedeutende Rolle spielt das Mikromilieu. Begleitet wird die neuronale Reifung von morphologischen Veränderungen wie der Ausbildung neuronaler Fortsätze (Hirose et al, 1998; Bito et al, 2000) und der Bildung von Vernetzungen. Die terminale Differenzierung resultiert schliesslich in der Anlage spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumkanäle (Kohyama et al, 2001; Hung et al, 2002b). Der neuronale Reifungsprozess ist also das Ergebnis eines Zusammenspiels vieler Faktoren. Ortsgebundene und sezernierte Signalmoleküle sind daran ebenso beteiligt, wie Komponenten der extrazellulären Matrix.

In-vitro können neuronale Vorläuferzellen und funktionelle postmitotische Neurone aus embryonalen Stammzellen (Okabe et al, 1996; Thomson et al, 1998; Lee et al, 2000; Xu et al, 2001; Carpenter et al, 2001; Wang et al, 2005b) oder Stammzellen des ZNS embryonaler (Carpenter et al, 1999; Tropepe et al, 1999; Vescovi et al, 1999) und adulter Gewebe (Richards et al, 1992; Vescovi et al, 1993; Morshead et al, 1994; Gage et al, 1995; McKay, 1997; Rao, 1999; Johansson et al, 1999; Toda et al, 2000) gewonnen werden. Die Protokolle für Anzucht und neuronale Induktion embryonaler und neuraler Stammzellen sind zeitaufwendig (mehrere Wochen bis Monate). Sie umfassen mehrere Stadien, die jeweils durch mitogene Faktoren und spezifische Signalmoleküle gekennzeichnet sind. Einige Protokolle erfordern eine komplexe Kokultur mit Fibroblasten oder Astrozyten als sogenanntes "*feeder layer*" (Wakayama et al., 2001; Song et al, 2002). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, die durch Serumentzug spontan differenzieren, müssen adulte Stammzellen durch spezifische Kulturbedingungen zur Ausprägung unterschiedlicher zellulärer Phänotypen stimuliert werden (Reyes et al, 2001). Die Etablierung geeigneter Protokolle zur Selektion neuronaler Vorläuferzellen aus leichter zugänglichen, somatischen Stammzellquellen - wenn möglich mit kürzerer Kulturzeit - würde einen entscheidenden Fortschritt darstellen.

1.2. Regeneration und Zellersatz durch Stammzellen

1.2.1. Stammzelle - Definition

Der Begriff Stammzelle geht auf die Untersuchungen von Till und McCulloch zurück, die vor über 50 Jahren die hämatopoietische Stammzelle des Knochenmarks (KM) als Paradigma der adulten Stammzelle identifizierten (Till & McCulloch, 1961; Becker et al, 1963). Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus. Selbst

undifferenziert sind sie imstande, differenzierte Tochterzellen zu bilden, die innerhalb eines Organs spezifische Funktionen übernehmen (Potten & Loeffler, 1990). Als Zeichen ihrer Stammzeleigenschaft lassen sich Stammzellen und Vorläuferzellen *in-vitro* klonal expandieren und in multiple Zelltypen differenzieren.

1.2.2. Embryonale versus adulte Stammzellen – Vor- und Nachteile

Embryonale Stammzellen besitzen das breiteste Differenzierungspotenzial (Thomson et al, 1998; Amit et al, 2000). In zahlreichen Untersuchungen konnte allerdings demonstriert werden, dass adulte Stammzellen in weit mehr Geweben als bisher angenommen residieren und enorm wandlungsfähig sind (Kuehnle & Goodell, 2002). Die überraschende Flexibilität adulter Stammzellen rückt sie bisweilen in die Nähe embryonaler Stammzellen.

Die Entwicklung differenzierter Nervenzellen aus embryonalen und neuralen Stammzellen ist im Gegensatz zu multipotenten Vorläuferzellen anderer adulter Gewebe besser verstanden. Zellen dieser Gewebe können in grosser Zahl expandiert und durch geeignete Kulturbedingungen oder Immunoselektion angereichert werden (Okabe et al, 1996; Muftaba et al, 1999; Vescovi et al, 1999; Lee et al, 2000; Carpenter et al, 2001; Maric et al, 2003). Wenig ist bislang über negative Folgen einer ausgedehnten Kulturdauer bekannt. Es gibt allerdings experimentelle Hinweise, dass nach langen Kulturzeiten das Differenzierungspotenzial von Stammzellen limitiert ist (Fricker et al, 1999; Quinn et al, 1999; Whittemore et al, 1999; Wright et al, 2006). Die klinische Verwendung embryonaler Stammzellen ist vor allem durch ethische Bedenken (Lachmann et al, 2001) und die notwendige Immunsuppression des Empfängers belastet. Die besonderen immunologischen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen erlauben es, die genannten Schwierigkeiten zu umgehen. Dank der Abwesenheit von HLA-Klasse-II-Oberflächenantigenen zeigen sie selbst nach Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen keine allogene Immunreaktion (Le Blanc, 2003b; Ryan et al, 2005); zudem scheinen sie immunmodulatorische Eigenschaften zu besitzen (Le Blanc et al, 2003a). Desweiteren erlauben sie, Zellen des potentiellen Empfängers zu verwenden, was immunologische Inkompatibilität ausschließt. Im Gegensatz zu neuralen Stammzellen sind mesenchymale Zellen des KM auch relativ einfach zu gewinnen (Mezey & Chandross, 2000). Die mögliche maligne Entartung embryonaler Stammzellen stellt eine weitere Problematik dar. Sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Zustand ist die Entstehung von Teratomen oder hochmalignen Teratokarzinomen möglich (Erdö et al, 2003; Levenstein et al, 2006; Riess et al, 2007). Experimentelle Arbeiten vor allem am Mausmodell zeigen, dass die aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Gewebe so genannte *imprinting-related* Entwicklungsstörungen aufweisen (Young et al, 1998; Reik & Walter, 2001; Humphrys et al, 2002; Sapienza, 2002; Mitalipou et al, 2007). Die Möglichkeit von Imprinting-Defekten stellt ein ernsthaftes Problem für die mögliche klinische Anwendung embryonaler Stammzellen dar. Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob adulte Stammzellen in dieser Hinsicht die bessere Wahl darstellen. Man muss annehmen, dass hier gleichermassen genetische und epigenetische Probleme auftreten könnten. Jüngste Untersuchungen geben erste Hinweise darauf: Adulte MSC können sich *in-vitro* in Tumorzellen transformieren (Rubio et al, 2008). In einem Mausmodell kam es nach Transplantation mesenchymaler Stromazellen auf dem Boden einer chronischen Infektion mit *Helicobacter pylori* zu intraepithelialen Tumoren (Houghton et al, 2004).

Die Möglichkeit, mit der Verwendung adulter Stammzellen diverse ethische und technische Schwierigkeiten umgehen zu können, macht sie derzeit dennoch zu einem attraktiven Forschungsgegenstand. Bevor sie allerdings breite klinische Anwendung finden können, besteht erheblicher Forschungsbedarf.

1.3. Mesenchymale Stromazellen

1.3.1. Definition

Das adulte KM enthält zwei prototypische Stamzellpopulationen: hämatopoietische und mesenchymale Stammzellen. Beide sind mesodermalen Ursprungs. Während sich von den hämatopoietischen Stammzellen alle Blutzellen ableiten, entwickeln sich Stammzellen des mesenchymalen Zellkompartiments in Abkömmlinge wie Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten (Friedenstein et al, 1976; Haynesworth, 1992b; Pittenger et al, 1999; Ciapetti, 2006). Die multipotenten Zellen wurden erstmals von Friedenstein identifiziert. Er zeigte, dass aus KM-Zellen, wenn sie in kälberserumhaltigem Medium kultiviert werden, adhärente fibroblastenähnliche Zellverbände entstehen, die sich in Knochenzellen und Adipozyten differenzieren. Nach den frühen Arbeiten von Friedenstein und Owen (Owen et al, 1988) erlebten die mesenchymalen KM-Zellen insbesondere nach der Arbeit von Pittenger und seinem Forschungsteam eine wahre Renaissance (Pittenger et al, 1999). Zahlreiche Veröffentlichungen haben infolge gezeigt, dass sich die Zellen klonal expandieren lassen und fähig sind, in Bindegewebszellen zu differenzieren (Muraglia et al, 2000; Gronthos et al, 2003). Unter bestimmten experimentellen Bedingungen zeigten die Zellen auch phänotypische Eigenschaften jenseits ihrer keimblatt-spezifischen Grenze, was als Ausdruck ihrer besonderen „Stammzell-Plastizität“ betrachtet wurde (Weissman, 2000; Herzog et al, 2003). So berichten viele Veröffentlichungen, dass mesenchymale Stromazellen unter bestimmten Kulturbedingungen auch den Phänotyp von Muskelzellen (Shiota et al, 2007), Herzmuskelzellen (Makino et al, 1999), neuronalen Zellen (s.u.) und Zellen endodermaler Herkunft wie Leberzellen (Oh et al, 2000), Alveolarzellen (Wang et al, 2005a), Nierenepithelien (Qian et al, 2008) und Pankreaszellen (Ianus et al, 2003; D'Ippolito et al, 2004; Oh et al, 2004) annehmen. Die über Jahrzehnte gewonnenen Erkenntnisse untermauern das Konzept einer mesenchymalen Stammzelle, wie es erstmalig von Caplan vorgeschlagen wurde (Caplan, 1994). Untersuchungen unterschiedlicher Laboratorien haben auch gezeigt, dass die mesenchymale Zellpopulation des KM eine heterogene Population von Zellen darstellt und Stammzellen sowie Vorläuferzellen unterschiedlicher Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit enthält (Phinney et al, 1999; Digirolamo et al, 1999; Bianco et al, 2001; Vogel et al, 2003; Boheler, 2004; Baksh et al, 2004). Für die ursprünglich als „*colony forming unit-fibroblasts*“ (CFU-F) oder „*marrow stromal fibroblasts*“ (MSF) (Castro-Malaspina et al, 1980; Kuznestov et al, 1997b) beschriebenen versatilen Zellen des stromalen Zellkompartiments, fanden ebenso die Termini „*marrow stromal cells*“ (MSC) oder „*mesenchymal progenitor cells*“ (MPC) Verwendung (Prockop, 1997; Conget & Minguell, 1999; Rosenthal, 2003). Die Bezeichnung „mesenchymale Vorläuferzellen“ geht konform mit der Vorstellung einer inhomogenen Population und schliesst die Anwesenheit limitierter Vorläuferzellen und multipotenter Stammzellen mit ein. Für die von uns verwendete Ausgangspopulation verwenden wir in Folge den neutralen Begriff „mesenchymale Stromazelle“ (MSC). Aus Gründen der Vergleichbarkeit von Studien wurde schliesslich versucht, allgemeingültige Minimalkriterien zu formulieren. Demnach werden multipotente MSC als KM-Zellen definiert, die unter Standardkulturbedingungen als adhärente, fibroblastenähnliche Zellen wachsen, in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren und einen definierten Phänotyp aufweisen (Dominici et al, 2006).

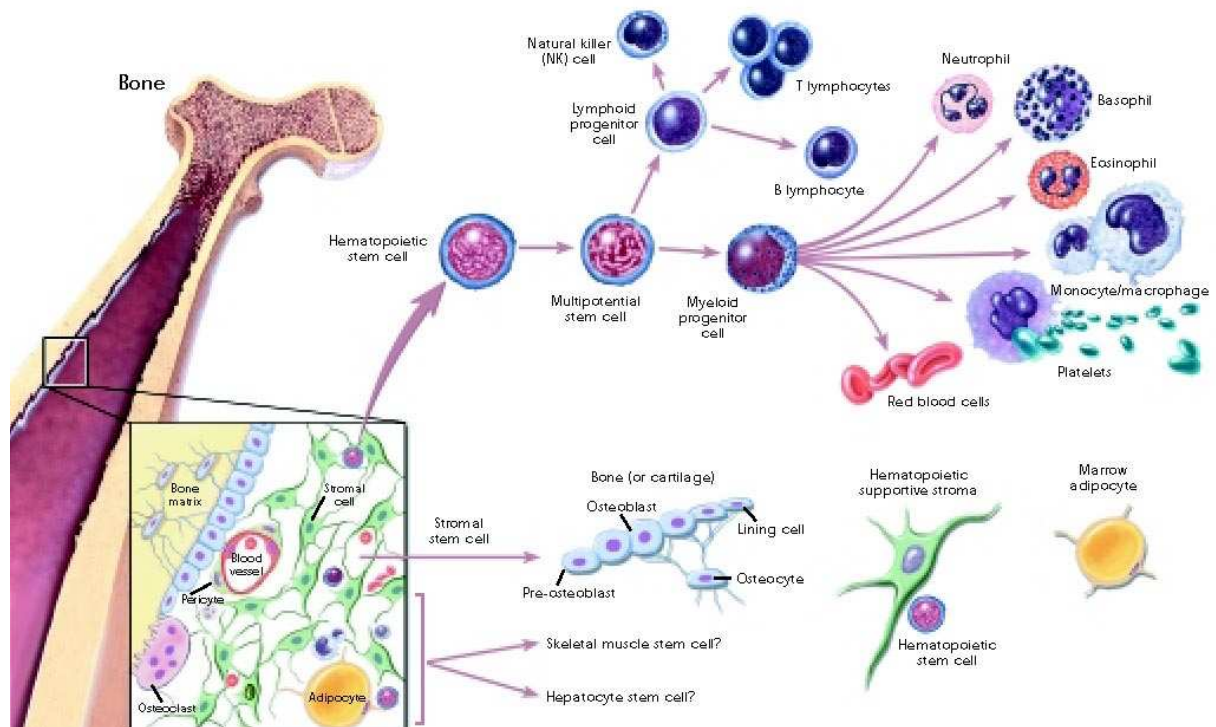


Abbildung 1: Differenzierungspotenzial hämatopoietischer und mesenchymaler Stammzellen (© 2001 Terese Winslow, aus: Stem cell basics, 2009)

1.3.2. Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Knochenmarkszellen

Isolierung

Mesenchymale KM-Zellen können durch verschiedene Verfahren isoliert und mit hoher Effizienz expandiert werden (Lennon & Caplan, 2006). Entspricht das Material einer KM-Punktion, wird das Aspirat mittels einer Dichtegradientenlösung (meist Percoll oder Ficoll-Gradienten) von Zelldebris und unerwünschten Zelltypen getrennt. Die Zellen in der oberen *low-density*-Fraktion werden dann weiter aufbereitet. Das KM-Aspirat wird in der Regel durch eine Punktion des Beckenkamms gewonnen (Pittenger et al, 1999; Murphy et al, 2002; Gronthos et al, 2003; Tondreau et al, 2005). Daneben wurden mesenchymale KM-Zellen auch aus Aspiraten von Tibia (Murphy et al, 2002), Femur (Oreffo et al, 1998; Murphy et al, 2002; Ciapetti et al, 2006), Sternum (Tondreau et al, 2005), sowie thorakalen und lumbalen Wirbelkörpersegmenten gewonnen (D'Ippolito et al, 1999).

Verschiedene Techniken der Aufreinigung des inhomogenen Zellaspirats wurden etabliert. Die herkömmliche Methode macht sich die selektive Adhäsion auf Plastikoberflächen zunutze. Die primären Zellkulturen werden in Standardmedium mit 20% Kälberserum expandiert. Die nicht adhärenen Zellen werden dabei nach 24-48h während des Mediumwechsels verworfen (Friedenstein et al, 1976; Pittenger et al, 1999). Ein Nachteil dieser einfachen Methode ist die zelluläre Heterogenität der Primärkultur. Um diesen Umstand zu vermeiden, wurden alternative Isolierungsmethoden entwickelt, die im Wesentlichen auf der Trennung nach zellspezifischen Oberflächenmolekülen beruhen (Simmons & Torok-Storb, 1991; Sanchez-Ramos et al, 2000; Reyes et al, 2001; Dennis et al, 2002; Jiang et al, 2002 & 2003; Gronthos et al, 2003; Locatelli et al, 2003; Padovan et al, 2003; Deschaseaux et al, 2003 & 2004; Tondreau et al, 2004b & 2005; Bossolasco et al, 2005; Letchford et al, 2006). Das zelluläre Ausgangsmaterial wird dabei direkt durch negative oder positive Selektion isoliert. Im Wesentlichen kommen zwei differente Trennungsvorgänge zur Anwendung: die RosetteSep-Prozedur mittels einer Antikörpermischung (StemCell Technologies, Vancouver,

Canada) und die MACS-Säulentrennung mittels Magnetbeads-gekoppelter Antikörper (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Verschiedene Subpopulationen mit einem höherem Anteil osteogener Vorläuferzellen (Simmons & Torok-Storb, 1991; Haynesworth et al, 1992a & 1992b; Rickard et al, 1996; Joyner et al, 1997; Stewart et al, 1999; Gronthos et al, 2003) und ausgeprägtem Differenzierungspotential (Locatelli et al, 2003; Kuçi et al, 2003; Padovan et al, 2003, Tondreau et al, 2005) wurden auf diese Weise gewonnen. Daneben beschrieben Hung und Kollegen ein Verfahren, wonach man durch eine Siebtechnologie eine Stammzell-angereicherte Population erhält. Dabei werden KM-Zellen in einer Doppeldecker-Kulturschale, deren oberer Kulturboden mit Poren von 3µm Grösse gefertigt ist, nach Zellgrösse separiert (Hung, 2002; Tzeng et al, 2004). Die Arbeitsgruppe um Pochampally isolierte eine Subpopulation humaner MSC durch Serumentzug (Pochampally et al, 2004). Die Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren kann den Anteil multipotenter MSC erhöhen: So konnten etwa Bianchi und Kollegen zeigen, dass die Zugabe von FGF-2 und ein 10%-Anteil von Kälberserum im Kulturmedium das Überleben und Differenzierungspotenzial der Zellen entscheidend verlängert (Bianchi et al, 2003). Ein entscheidender Nachteil der unterschiedlichen Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen ist die Tatsache, dass es hinsichtlich der Charakterisierung MSC bislang keine Übereinstimmung gibt. Je nach Methode sind unterschiedliche MSC-Populationen beschrieben worden (Baksh et al, 2004). Keines der Protokolle hat bislang eine breite Akzeptanz gefunden. Gegenüber der Plastikadhärenzmethode wird durch die technischen Verfahren rascher eine Kultur hoher Reinheit erreicht. Durch die herkömmliche Standardprozedur erhält man dagegen nach drei Passagen eine relativ homogene Zellpopulation, die einer durch die technischen Trennungsvorgänge isolierten Population vergleichbar ist (Tondreau et al, 2004b).

MSC-ähnliche Zellen wurden auch aus anderen Geweben isoliert. Allerdings unterscheiden sich die aus den unterschiedlichen Quellen gewonnenen MSC in ihren Eigenschaften (Kern et al, 2006; Liu et al, 2007; Baksh et al, 2007). Das KM ist und bleibt daher die primäre Quelle MSC.

Morphologie und Entwicklungsstadien der Zellkultur

In Anlehnung an die Phasen bakteriellen Wachstums wurde ein dreiphasiges Zellkulturmodell vorgeschlagen (Colter et al, 2000). Nach einer initialen Latenzphase wachsen MSC als Monolayer breiter und flacher Zellen und nehmen mit zunehmender Zelldichte eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Morphologie an. Unter geeigneten Kulturbedingungen kommt es zur Ausbildung von Zellkolonien (sogenannter „*colony forming units*“, CFU), die von einzelnen Vorläuferzellen abstammen und deren Frequenz mittels CFU-Assay bestimmt wird (Friedenstein et al, 1974). Die Anzahl von Zellkolonien variiert mit der Isolierungsmethode, den Kulturbedingungen und dem Alter des Spenders; ausserdem bestehen Speziesunterschiede (Kuznetsov et al, 1997; Bianco et al, 2001). Der CFU-Assay wird auch verwendet, um den Anteil mesenchymaler Stammzellen innerhalb der Zellkultur abzuschätzen. Demnach finden sie sich mit einer Häufigkeit von 0,001-0,01% unter den mononukleären KM-Zellen (Gronthos et al, 2003; Tondreau et al, 2005). Erreichen die Kulturen eine hohe Zelldichte, hören die Zellen auf, sich zu teilen (Pittenger et al, 1999, Woodbury et al, 2000; Bianco et al, 2001).

Spezifische Kulturbedingungen führen zur Selektion unterschiedlicher Subpopulationen MSC. Bereits Friedenstein und Kollegen konnten in ihren Kulturen beobachten, dass die Zellkolonien in Grösse und Morphologie erheblich variieren und sich bei längerer Kulturdauer Zellen unterschiedlichen Phänotyps zeigen (Friedenstein et al, 1982). Mets und Verdonk beschrieben zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen: spindelförmige sich teilende Vorläuferzellen (Typ 1) und einen reiferen Zelltyp (Typ 2) mit abgeflachtem Zellkörper (Mets & Verdonk, 1981). Colter und Kollegen identifizierten in ihren Zellkulturen

bei niedriger Zelldichte eine Subpopulation schnell proliferierender Vorläuferzellen und nannten sie „*recycling stem cells*“ (RS-Zellen) (Colter et al, 2000 & 2001; Sekiya et al, 2002). Die Arbeitsgruppe um Verfaillie expandierte bei niedriger Zelldichte und niedrigem Serumanteil eine Fraktion multipotenter Vorläuferzellen, die sie zunächst als „*mesodermal progenitor cells*“ (MPC) (Reyes et al, 2001) und später als „*multipotent adult progenitor cells*“ (MAPC) (Reyes & Verfaillie, 2001; Reyes et al, 2005) bezeichneten. Andere multipotente Stammzellfraktionen wurden aus humanem KM isoliert und als „*marrow-isolated adult multilineage inducible cells*“ (MIAMI) (D'Ippolito et al, 2004 & 2006a) und „*bone marrow-derived multipotent stem cells*“ (BMSC) (Yoon et al, 2005) bezeichnet.

1.3.3. Phänotypisierung mesenchymaler Knochenmarkszellen

In zahlreichen Studien wurde der Phänotyp der isolierten Zellpopulation anhand der Oberflächenmoleküle beschrieben (Young et al, 1999; Pittenger et al, 1999; Conget & Minguell, 1999; Woodbury et al, 2000; Colter et al, 2000 & 2001; Reyes et al, 2001; Jiang et al, 2002; Hung et al, 2002; Gronthos et al, 2003; Joannides et al, 2003; D'Ippolito et al, 2004 & 2006a; Hermann et al, 2004; Scintu et al, 2006; Battula et al, 2007). Übereinstimmung herrscht darüber, dass es sich bei den MSC um eine CD45-negative Zellpopulation handelt. MSC exprimieren typischerweise keinen der hämatopoietischen Marker CD11b, CD14, CD31, CD34 und sind positiv für die Oberflächenmarker CD29, CD44, und CD90 sowie das HLA-Klasse-I-Oberflächenantigen (Pittenger et al, 1999; Colter et al, 2000; Tondreau et al, 2004a; Battula et al, 2007; Phinney & Prockop, 2007).

Für die von unterschiedlichen Laboratorien isolierten Subpopulationen MSC wurden gegenüber den reifen Zelltypen spezifische Unterschiede im Phänotyp beschrieben. So exprimieren die von Reyes und Kollegen bei niedriger Zelldichte und niedrigem Serumanteil expandierten MPC kein HLA-DR oder HLA-Klasse-I-Antigen und nur niedrige Level des Rezeptormoleküls CD44 (Reyes et al, 2001). Die ebenso von der Verfaillie-Arbeitsgruppe beschriebenen MAPC exprimieren im Gegensatz zu MSC keinen der für letztere typischen Oberflächenmarker CD105, CD44 oder CD37 und erweisen sich positiv für die Marker FLK-1, Sca-1 und CD13 (Reyes et al, 2005). Die von der Arbeitsgruppe Prockop als Vorläuferzellen charakterisierten RS1- & RS2-Zellen unterscheiden sich von den reiferen Zelltypen darin, dass sie für die Marker CD117, CD90 oder Stro-1 nur schwach positiv sind (Colter et al, 2000 & 2001). Gegenüber in Standardkulturbedingungen kultivierten MSC exprimieren die von der Arbeitsgruppe Habisch favorisierte Subpopulation von „*human marrow-derived neural stem cell-like cells*“ (hmNSC) kein CD166 und höhere Levels von CD90 (Hermann et al, 2004).

Bemühungen, einen einheitlichen Phänotyp MSC zu beschreiben, haben sich als mühsam erwiesen. Zwischen den Laboratorien bestehen Unterschiede im beobachteten Expressionsmuster der Oberflächenantigene, was durch Unterschiede in den Aufbereitungsprozeduren und Kulturbedingungen, durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad und die Heterogenität der Zellpopulation selbst erklärt werden kann (Baksh et al, 2004). Bis heute fehlen entsprechende Marker zur Identifizierung der mesenchymalen Stammzelle. STRO-1 wurde vor einigen Jahren in dieser Hinsicht als vielversprechendes Oberflächenantigen diskutiert (Simmons & Torok-Storb, 1991; Gronthos & Simmons, 1995; Dennis et al, 2002; Gronthos et al, 2003). Seine Bedeutung hat sich aber mittlerweile wieder relativiert.

Ein Vergleich der verschiedenen Studienergebnisse wird folglich durch die unterschiedlichen Charakteristiken der untersuchten Zellpopulationen erschwert. Die Kenntnis mesenchymaler Stammzellmarker ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt leider ungenügend. Bislang ist es daher nicht möglich, eine Reinkultur mesenchymaler Stammzellen zu gewinnen.

1.3.4. Elektrophysiologische Eigenschaften mesenchymaler Knochenmarkszellen

Heubach und Kollegen unternahmen den wichtigen Versuch einer elektrophysiologischen Charakterisierung undifferenzierter humaner MSC (Heubach et al, 2003). Dabei wurden in nahezu allen untersuchten Zellen zwei unterschiedliche Auswärtsströme registriert. Der am häufigsten vorkommende Auswärtsstrom konnte dem Kaliumionenkanal Maxi-K zugeordnet werden. Die Natur des zweiten Auswärtsstroms mit einer langsameren Kinetik und einem negativeren Aktivierungspotential konnte nicht identifiziert werden. Für eine kleine Zellfraktion konnte die Arbeitsgruppe funktionelle Ca-Kanäle nachweisen. Andere Einwärtsströme wie etwa Natriumströme waren in den untersuchten Zellen nicht nachweisbar. Egussa und seine Arbeitsgruppe konnten in ihren Untersuchungen an murinen MSC im nicht-induzierten Zustand nicht näher definierte spannungsabhängige Einwärtsströme nachweisen und sahen darin eine konstitutive Eigenschaft MSC (Egusa et al, 2005). Gegenüber neuronal induzierten MSC wiesen die gemessenen Ströme eine kleinere Amplitude auf.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an MSC zeigen insgesamt ein heterogenes Bild hinsichtlich Frequenz und Verteilung der Ionenströme. Diese Beobachtung ist möglicherweise Ausdruck des Umstandes, dass die untersuchten Zellen keine homogene Population repräsentieren, sondern Zellfraktionen mehr oder weniger differenzierter Zellen umfasst. Die Ausbildung unterschiedlicher Ionenströme könnte andererseits auch von externen Stimuli abhängig sein oder mit dem Zellzyklus variieren.

1.3.5. Plastizität mesenchymaler Knochenmarkszellen

Die zahlreichen Untersuchungen zur Plastizität MSC können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Untersuchungen in der Zellkultur (*in-vitro*) und Transplantationsstudien (*in-vivo*). Experimentelle Hinweise, dass MSC unter bestimmten Bedingungen neuronale Marker exprimieren und offenbar das Potential besitzen, sich in neuronale Zellen umzuwandeln, ergaben sich zunächst aus entsprechenden Beobachtungen in Transplantationsstudien.

In-vivo

Eglitis und Mezey konnten nach intravenöser Verabreichung retroviral markierter oder gegengeschlechtlicher KM-Zellen sowohl makroglial als auch mikroglial differenzierte Donorzellen im Hirnparenchym nachweisen und demonstrierten damit erstmals, dass Vörläuferzellen des KM unter bestimmten Bedingungen in das zentrale Nervensystem einwandern und sich dort umdifferenzieren können (Eglitis & Mezey; 1997). Bei zusätzlicher Läsion des ZNS durch Ischämie zeigte sich ein aktives „*targeting*“ der transplantierten Zellen (Eglitis et al, 1999).

Eine Serie von Transplantationsversuchen zeigte infolge, dass humane und murine KM-Zellen oder daraus selektierte Subpopulationen in das zentrale Nervensystem der Empfängertiere migrieren und sich dort in Zellen mit neuronalem und glialem Phänotyp umwandeln (Azizi et al, 1998; Kopen et al, 1999; Bonilla et al, 2002; Corti et al, 2002a & 2002b; Muñoz-Elias et al, 2004; Deng et al, 2006). Nach Angaben von Azizi und Kollegen waren weder für humane noch für murine Donorzellen bei den neugeborenen Empfängertieren Anzeichen einer Entzündungs- oder Abstossungsreaktion sichtbar. 20% der direkt in das Striatum injizierten Zellen überlebten und zeigten ein ähnliches Migrationsmuster wie implantierte neurale Stammzellen und Astrozyten (Azizi et al, 1998). Das *Engraftment* und Migrationsverhalten MSC unterscheidet sich damit deutlich von dem transplantierten Fibroblasten, die nach Transplantation weiterhin Kollagen produzieren und eine reaktive Gliose provozieren (Kawaja & Gage, 1992). In einer späteren Untersuchung an adulten Empfängertieren wurden allerdings ausgeprägte Entzündungs- und Abstossungsreaktionen und eine markante Astroglie beobachtet. Ausserdem konnten keine Donorzellen, die neuronale Antigene exprimieren, detektiert werden (Coyne et al, 2006). Muñoz-Elias und Kollegen verfolgten

erstmalig das Schicksal transplantierte MSC in embryonalem Hirngewebe (Muñoz-Elias et al, 2004). Die Spenderzellen exprimierten je nach Untersuchungszeitpunkt und Gehirnregion unterschiedlich neuronale Marker.

In-vivo-Studien neuronaler Differenzierung MSC umfassen auch die systemische Verabreichung von Spenderzellen (Mezey et al, 2000; Brazelton et al, 2000; Nakano et al, 2001). Mezey und Kollegen implantierten neugeborenen weiblichen PU.1 *knockout*-Mäusen intraperitoneal unselektionierte KM-Zellen männlicher Tiere. Die konfokale Mikroskopie der untersuchten Hirnschnitte bestätigte für 0,3-2,3% die Präsenz des Y-Chromosoms und die Expressierung zweier neuronaler Marker (Mezey et al, 2000). Konsistent mit diesen Beobachtungen sind die Untersuchungen von Brazelton und Kollegen nach intravaskulärer Verabreichung gentechnisch markierter adulter KM-Zellen der Maus in tödlich bestrahlte Empfängertiere (Brazelton et al, 2000). Die quantitative Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie ultradünner Gehirnschnitte des Bulbus olfactorius ergab, dass etwa 0,2-0,3% der untersuchten neuronalen Zellen vom Spenderknochenmark stammten. Darüber hinaus zeigte die positive Färbereaktion für pCREB, dass die differenzierten Spenderzellen imstande waren, den Transkriptionsfaktor CREB zu phosphorylieren, ein Indiz dafür, dass zumindest ein wichtiger Signaltransduktionsweg in den transplantierten KM-Zellen intakt ist. In ihren Untersuchungen an GFP-Knochenmarkschimären fanden Priller und Kollegen nach Transplantation in myeloablatierte Wildtyp-Mäuse vereinzelt GFP-markierte Zellen, die den neuronalen Marker NeuN exprimierten. Im Gegensatz zu oben genannten Befunden waren allerdings mehrere Monate nach Transplantation keine GFP/NeuN-positiven Zellen mehr nachweisbar. Trotz des zunächst negativen Befundes untersuchten Priller und Kollegen Empfängertiere 10 bis 15 Monate nach KM-Transplantation und fanden im Kleinhirn terminal differenzierte Purkinje-Zellen mit GFP-Markierung, die maximal 0,1% aller Purkinje-Zellen des Cerebellums ausmachten. Der Nachweis synaptischer Kontakte und der Expression des Neurotransmitter-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase liefert starke Hinweise darauf, dass die vom Spendertier abstammenden Zellen funktionell in ihre Umgebung integriert waren (Priller et al, 2001).

Nakano und Kollegen zeigten, dass sich transplantierte KM-Zellen nach intraparenchymaler Injektion in das Striatum bestrahlter Mäuse reaktiv für astrozytäre, oligodendrozytäre und mikrogliale Marker zeigten. Nach systemischer Verabreichung konnten dagegen nur mikrogliale differenzierte Spenderzellen nachgewiesen werden (Nakano et al, 2001). Sasaki und seine Arbeitsgruppe transplantierten eine Zellfraktion hämatopoietischer und stromaler KM-Zellen nach axonaler Schädigung in das Rückenmark adulter Nager und konnten eine gezielte Differenzierung in Oligodendrozyten beobachten (Sasaki et al, 2001). Andere Forschergruppe fand keine Donorzellen nach Transplantation (Castro et al, 2002; Wehner et al, 2003; Ono et al, 2003; Massengale et al, 2005). Positive Ergebnisse im Tierversuch konnten auch post mortem bei Patienten nachvollzogen werden, die sich aus therapeutischen Gründen einer KM-Transplantation unterziehen mussten (Mezey et al, 2003; Weimann et al, 2003a; Cogle et al, 2004; Sostak et al, 2007).

Es ist bezeichnend, dass gerade hochselektionierte Zellpopulationen wie MAPC (Reyes & Verfaillie, 2001; Reyes et al, 2005) oder hmNSC (Hermann et al, 2004) nach Transplantation kein signifikantes *Engraftment* (Jiang et al, 2002; Habisch et al, 2007) zeigen. Es muss ausserdem bemerkt werden, dass sich die Transplantationsstudien in ihrem experimentellen Setting erheblich unterscheiden. Eine intakte Blut-Hirn-Schranke in nicht-bestrahlten Tieren oder bei *low-dose* Regimen ist eine mögliche Erklärung für negative Befunde bei systemischer Verabreichung. Andere Autoren stellten fest, dass die wenigen Zellen, die in das Gehirn eingewandert waren, mit residenten Zellen fusionierten und dabei den Phänotyp der originären Nervenzellen annahmen (Alvarez-Dolado et al, 2003; Weimann et al, 2003b).

Insgesamt ergibt sich aus der Zusammenschau der *in-vivo*-Studien ein inhomogenes Bild. Die Mehrzahl der Untersuchungen legt den Schluss nahe, dass KM-Zellen - wenn auch in geringer

Zahl - imstande sind, in das Gehirn einzuwandern und sich dort in funktionelle neuronale Zellen zu differenzieren, möglicherweise sogar beim Menschen. Die Berichte unterstreichen ebenso die Bedeutung eines lokalen permissiven Milieus für eine spezifische neuronale, astrozytäre und oligodendrozytäre Differenzierung. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, unter welchen Bedingungen und auf Basis welcher Mechanismen funktioneller Zellersatz adulter Gewebe nach Transplantation stattfindet.

In vitro

Die Möglichkeit, dass MSC neurogenes Potential besitzen, motivierte zahlreiche Arbeitsgruppen dazu, die neuronale Differenzierung multipotenter KM-Zellen durch geeignete Kulturbedingungen *in-vitro* zu reproduzieren, nicht zuletzt mit dem Interesse, die Mechanismen der beobachteten Plastizität näher zu untersuchen.

Sanchez-Ramos und Kollegen expandierten Sca-1 und CD34-depletierte murine und humane KM-Zellen in EGF-haltigem Medium und induzierten sie anschliessend in Vitamin-A-Säure- und BDNF-haltiger Kulturbedingung. Die immunhistochemische Analyse ergab die Expression neuronaler Marker wie NeuN, Nestin und GFAP (Sanchez-Ramos et al, 2000). Wenig später brachten Woodbury und Kollegen humane und murine KM-Zellen durch Vorbehandlung mit BME oder bFGF und einem Induktionsmedium mit Zugabe von DMSO und BHA dazu, neuronale Charakteristiken zu zeigen (Woodbury et al, 2000). Mit einem optimierten Protokoll zeigten binnen weniger Stunden nahezu 80% der behandelten Zellen eine neuronale Morphologie. Die immunhistochemische Färbung der behandelten Zellen resultierte bereits nach 5 Stunden positiv für die neuronalen Proteine NSE und NF-M. Ebenso wie Sanchez-Ramos beobachtete die Arbeitsgruppe von Woodbury mit der neuronalen Differenzierung eine Abnahme des Intermediärfilaments Nestin, das in unreifen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Lendahl et al, 1990). Vereinzelt konnten auch positive Färbungsergebnisse für Marker eines reiferen neuronalen Phänotyps (TrkA, Tau) erzielt werden.

Nach diesen beiden Studien folgte eine Reihe von Veröffentlichungen. Mit den unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen exprimierten zwischen 0,5 und 70% der untersuchten MSC neuronale Markerproteine. So zeigten Deng und Kollegen, dass durch Kulturbedingungen, die intrazelluläres cAMP erhöhen (IBMX/dbcAMP), die Expressierung neuronaler Marker verstärkt wurde (Deng et al, 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten allerdings auch an Tumorzellen demonstriert werden (Cox et al, 1999). Kim und Kollegen verwendeten Vitamin-A-Säure und den Wachstumsfaktor FGF-2 zur neuronalen Induktion humaner KM-Zellen und erreichten durch die Beschichtung der Objektträger (OT) mit Fibronektin einen höheren Anteil Neurofilament-exprimierender Zellen (Kim et al, 2002). Zhang und Kollegen machten in ihren Untersuchungen deutlich, dass die Kombination des Wachstumsfaktors bFGF und des Gangliosids GM1 synergistisch in der Ausprägung eines neuronalen und glialen Phänotyps bei MSC der Ratte wirkt (Zhang et al, 2004). Tropel und Kollegen konnten durch die Kombination des Wachstumsfaktors bFGF und einer Beschichtung mit Poly-L-Lysin eine neuronale Differenzierung muriner MSC erreichen. Durch die Behandlung exprimierten nahezu alle Zellen den für neuronale Vorläuferzellen typischen Marker Nestin und zu einem hohen Anteil neuronale Proteine wie NF-L und β -III-Tubulin. Ausserdem zeigten sich die Zellen reagibel für die Neurotransmitter Glutamat und Dopamin. Die induzierten, für Neurone typischen morphologischen Veränderungen bildeten sich allerdings nach sieben Kulturtagen spontan zurück (Tropel et al, 2006). Cho und Kollegen konnten in ihren Versuchsbedingungen Aktionspotentiale und post-synaptische Ströme in neuronal induzierten MSC registrieren (Cho et al, 2005). Auch Egusa und sein Forschungsteam erreichten nach neurogener Kulturbedingung das Ausbilden von spannungs-aktivierten Natrium- und Kaliumströmen in den behandelten murinen KM-Zellen (Egusa et al, 2005).

Eine Reihe von Arbeitsgruppen beschrieben Methoden, MSC gezielt in Zellen mit Charakteristiken spezifischer neuronaler Subtypen zu differenzieren: die Expression von Neurotransmittern oder assoziierten Proteinen (Woodbury et al, 2002; Jiang et al, 2002; Jin et al, 2003a; Dezawa et al, 2004; Tondreau et al, 2004a; Hermann et al, 2004; Wislet-Gendebien et al, 2005; Guo et al, 2005; Tao et al, 2005; Kondo et al, 2005; Cho et al, 2005; Long et al, 2005; Pacary et al, 2006; Kan et al, 2007; Song et al, 2007; Tatard et al, 2007; Barzilay et al, 2008), von Glutamat-Rezeptor (Jin et al, 2003a; Kondo et al, 2005), Schwannzellmarkern (Caddick et al, 2006); Glutamat-Transporter (Dezawa et al, 2004; de Hemptinne et al, 2004), synaptischen Vesikelproteinen (Woodbury et al, 2002; Cho et al, 2005) und neurotrophen Rezeptoren (Jeong et al, 2004; D'Ippolito et al, 2004; Wislet-Gendebien et al, 2005) wurden in induzierten MSC nachgewiesen. Einigen Forschern gelang es, MSC in Zellen mit typischen elektrophysiologischen Eigenschaften reifer Neurone umzuwandeln (Kohyama et al, 2001; Jiang et al, 2002; Hung et al, 2002b; Dezawa et al, 2004; Hermann et al, 2004; Egusa et al, 2005; Wislet-Gendebien et al, 2005; Mareschi et al, 2006; D'Ippolito et al, 2006a; Song et al, 2007).

Einige Forschergruppen verwendeten gentechnische Strategien, die besonders im Hinblick auf die therapeutische Anwendung MSC von Relevanz sind (Levy et al, 2003; Dezawa et al, 2004; Zhao et al, 2004; Zeng et al, 2007). Andere Laboratorien orientierten sich an Kulturprotokollen embryonaler und neuraler Stammzellen und isolierten aus mesenchymalen KM-Zellen neurogene Vorläuferzellen in Neurosphären (Kohyama et al, 2001; Kabos et al, 2002; Locatelli et al, 2003; Joannides et al, 2003; Hermann et al, 2004; Shiota et al, 2007).

Die Bedeutung von Umgebungsfaktoren und Zell-Zell-Kontakt für die neuronale Differenzierung MSC wurde in Kokulturmodellen und Kulturbedingungen mit konditionierten Medien untersucht: Im Kokulturmodell mit mesencephalen oder striatalen Zellen fanden Sanchez-Ramos und Kollegen, dass die Kokultur den Anteil NeuN- und GFAP-positiven Zellen erhöhte (Sanchez-Ramos et al, 2000). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichteten Abouelfetouh und Kollegen später, dass MSC in Kokultur mit hippokampalen Hirnschnitten Charakteristiken neuronaler Zellen zeigten (Abouelfetouh et al, 2004). Bossolasco und Kollegen evaluierten in ihren Versuchsreihen die Effekte zellulärer Signale anhand von Kokultursystemen mit neuronalen Stammzellen oder Astroblasten mit oder ohne Zell-Zell-Kontakt (Transwell) sowie konditionierten Medien. Dabei zeigten sich insbesondere für die Versuchsbedingungen mit Astrozyten-konditioniertem Medium positive Resultate für neuro-gliale Marker (Bossolasco et al, 2005). Effekte eines Astrozyten-konditionierten Mediums auf neuronale Differenzierung wurden ebenso von Joannides und Kollegen an isolierten neuronalen Vorläuferzellen humaner Haut (Joannides et al, 2004) und adulten humanen KM (Joannides et al, 2003) demonstriert. Ein auf Kokultur mit fetalen Maus-Astrozyten basierendes Induktionsprotokoll führte zu einem höheren Anteil GFAP-positiver Zellen (Lei et al, 2007).

Die von der Arbeitsgruppe Verfaillie innerhalb der durch Depletion von CD45+ und Glykophorin-A+ Zellen gewonnen Zellpopulation der MAPC differenzieren nach langer Kulturdauer in mesenchymale Zelltypen, Skelettmuskelzellen, und endotheliale Zellen (Reyes et al, 2001). Für die von Maus und Ratte isolierten MAPC wurde ausserdem eine neurale Differenzierung *in-vitro* gezeigt. Die Induktion mit FGF-2 ergab Zellen mit neuronalen, astrozytären und oligodendrozytären Markern. Die Verwendung eines sequentiellen Behandlungsprotokolls mit den Wachstumsfaktoren bFGF, FGF-8b und BDNF ergab dopaminerge, serotonerge und gabaerge Nervenzellen (Jiang et al, 2002). Ein komplexes Kokultursystem mit Astrozyten induzierte einen reiferen Phänotyp. Ähnlich den aus NSC und ES abgeleiteten Neuronen zeigten die *in-vitro*-differenzierten MAPC für Neurone typische elektrophysiologische Eigenschaften (Jiang et al, 2003; Verfaillie et al, 2003). Nach Angaben der Forscher liessen sich ein nicht näher bestimmter auswärts gerichteter Ionenstrom und spannungsaktivierte schnelle Natriumkanäle nachweisen. In der Mehrzahl der untersuchten

Zellen konnten wiederholt Aktionspotentiale ausgelöst werden. Die Genexpressionsanalyse induzierter MAPC zeigte, dass Transkriptionsfaktoren, wie sie auch bei der Differenzierung dopaminerger und serotinerger Neurone in der Mittelhirnregion involviert sind, in ähnlicher Weise während des Differenzierungsprozesses der MAPC aktiviert werden. Allerdings mussten die Autoren feststellen, dass es bei dem auf Wachstumsfaktoren basierten Induktionsprotokoll nach 3 Wochen rasch zu einem Verlust der Zellkultur durch Zelltod kam und die neuronal differenzierten Zellen nur in anschließender Kokultur mit Astrozyten überlebensfähig waren. Zusammen mit den Untersuchungen von Joannides und seiner Arbeitsgruppe (s.o.) unterstreicht diese Beobachtung die Bedeutung astrozytärer Signale für Überleben und terminale Differenzierung der von KM-Zellen abgeleiteten Neurone. Bislang konnten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Verfaillie allerdings nicht reproduziert werden (Raedt et al, 2007). D'Ippolito und Kollegen selektionierten nach einem speziellen Expansionsprotokoll und unter Hypoxiebedingungen ähnlich pluripotente Zellen, die sie als MIAMI bezeichneten (D'Ippolito et al, 2004 & 2006a & 2006b). Nach Induktion zeigten die terminal differenzierten Zellen elektrophysiologische Eigenschaften, die sich nach Angaben der Autoren nicht von denen reifer Neurone unterscheiden. Für MIAMI-Zellen wurden Marker nachgewiesen, die auch von embryonalen Stammzellen exprimiert werden (D'Ippolito et al, 2004 & 2006a). Auch von einer gezielten Differenzierung in dopaminerge Neurone wurde berichtet (Tatard et al, 2007). Nach den experimentellen Hinweisen, dass sich Hypoxiebedingungen günstig auf neuronale Differenzierung auswirken (Hermann et al, 2004; D'Ippolito et al, 2006b), zeigten Pacary und Kollegen in ihren Untersuchungen an murinen MSC, dass eine pharmakologische Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch Kobaltchlorid und Deferoxamin eine Umwandlung in Zellen mit Charakteristiken neuronaler Zellen induziert. Die zusätzliche Inhibierung des ROCK-Signalwegs führte zu einer dopaminergen Differenzierung (Pacary et al, 2006).

Wichtige Erkenntnisse ergeben sich auch aus vergleichenden Untersuchungen: Die Gegenüberstellung der Induktionsprotokolle von Woodbury (Woodbury et al, 2002) und Deng (Deng et al, 2001) durch Rismanchi und Kollegen bestätigte für das Woodbury-Protokoll einen deutlichen Anstieg von Zelltod unter differenzierten Zellen. Während mit dem Woodbury-Protokoll ein signifikanter Anstieg der NeuN-Expression zu beobachten war, zeigte sich für das Deng-Protokoll lediglich in der Tendenz eine Zunahme NeuN-positiver Zellen. Für beide Protokolle war zur Aufrechterhaltung eines neuronalen Phänotyps die kontinuierliche Kultivierung in einem Erhaltungsmedium erforderlich (Rismanchi et al, 2003). Bossolasco und seine Forschergruppe untersuchten unterschiedliche Populationen adulter KM-Zellen hinsichtlich ihres neurogenen Potentials bei definierten Kulturbedingungen (unfraktioniertes KM, *low-density* BMNC, MSC, sowie einige immunomagnetisch separierte Subpopulationen). Als interessante Kandidaten mit neuro-glialem Differenzierungspotenzial resultierten nach den Untersuchungen Bossolasco's lediglich MSC und CD90-positive KM-Zellen. Negative Resultate wurden für alternative Quellen mesenchymaler Stammzellen wie peripheres Blut und mobilisiertes peripheres Blut erzielt (Bossolasco et al, 2005). Scintu und Kollegen verglichen zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle: das erste Protokoll verwendete einen Cocktail aus FGF-1 und Ko-Aktivatoren mit dem Effekt, intrazelluläres cAMP zu erhöhen (TPA, IBMX und Forskolin). Das zweite Behandlungsprotokoll verwendete Vitamin-A-Säure zusammen mit BME als Induktoren. Für beide Differenzierungsprotokolle zeigte sich zum Ende des Differenzierungsprozesses ein kleiner Anteil an Zellen (15-20%), die die neuronalen Marker NF-M, GFAP und NSE exprimierten, während die Proteine Vimentin und Nestin gegenüber der Kontrolle in geringerem Masse nachweisbar waren. Während mit FGF-1 und den beigefügten Ko-Aktivatoren die Zellen bereits nach 6-24h eine charakteristische neuronale Morphologie zeigten, entwickelten sich die morphologischen Veränderungen mit dem zweiten Behandlungsprotokoll erst nach einem längeren Zeitfenster und waren weniger markant

ausgeprägt. Die neuronale Morphologie der Zellen bildete sich rasch zurück, sobald die Induktoren des ersten Protokolls aus der Kulturbedingung entfernt wurden. Zellen, die mit Vitamin-A-Säure und BME behandelt wurden, behielten dagegen ihre Morphologie bei, selbst nachdem die stimulierenden Substanzen aus dem Kulturmedium entfernt wurden (Scintu, 2006). Song und Kollegen untersuchten Nestin-positive murine KM-Zellen und verglichen sie mit adulten murinen NSC. Mit Ausnahme TH- und GalC-positiver Zellen war in den Kulturen NSC der Anteil an Zellen, die neuronale Marker exprimierten, deutlich höher. In den funktionellen und elektrophysiologischen Tests nach einer Woche neuronaler Induktionskultur (in Ahnlehnung an Sanchez-Ramos-Protokoll) konnte die Arbeitsgruppe nur einen geringen Anteil funktioneller Nervenzellen unter den neuronal differenzierten MSC feststellen. Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigten 2,5% der untersuchten KM-Zellen und 60% der gepatchten NSC einen unreifen neuronalen Phänotyp (Song et al, 2007).

1.4. Klinische Relevanz

Das therapeutische Potential MSC wurde in Tiermodellen unterschiedlicher Erkrankungen evaluiert. Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse fand die versatile Zellpopulation bereits in klinische Studien Anwendung (*reviewed* von Tögel et al, 2007).

1.4.1. Erkenntnisse aus dem Tierversuch

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass nach KM-Transplantation Donorzellen zu multiplen Zelltypen differenzieren und zur Regeneration von Muskel (LaBarge & Blau, 2002; Corti et al, 2002c; Bossolasco et al, 2004), Herzmuskel (Orlic et al, 2001a & 2001b; Toma et al, 2002;), Lunge (Kotton et al, 2001; Krause et al, 2001; Theise et al, 2002; Jiang et al, 2002; Wang et al, 2005a), Haut (Krause et al, 2001), Gastrointestinaltrakt (Krause et al, 2001; Jiang et al, 2002), Pankreas (Jiang et al, 2002; Ianus et al, 2003; Hess et al, 2003; Oh et al, 2004), Niere (Kale et al, 2003; Poulsom et al, 2001; Ito et al, 2001; Prodromidi et al, 2006; Qian et al, 2008), Leber und Gallengängen (Petersen et al, 1999; Lagasse et al, 2000; Theise et al, 2000; Krause et al, 2001; Jiang et al, 2002; Chamberlain et al, 2007) beitragen können.

Erkenntnisse aus Untersuchungen zum epithelialen Chimärismus beim Menschen nach KM-Transplantation (Gussoni et al, 2002; Körbling et al, 2002; Okamoto et al, 2002; Mezey et al, 2003; Suratt et al, 2003; Weimann et al, 2003a; Spyridonidis et al, 2004; Cogle et al, 2004; Crain et al, 2005; Spencer et al, 2005) unterstützen ebenfalls das Konzept, dass sich transplantierte Donorzellen in unterschiedlichen Geweben ansiedeln können. Erkenntnisse aus dem Bereich der Organtransplantation zeigen andererseits, dass es bei Organschädigung zu einer Rekrutierung Empfänger-eigener Vorläuferzellen kommt (Kleeberger et al, 2002 & 2003; Quaini et al, 2002) und KM-Zellen mitunter an der Organregeneration partizipieren (Grimm et al, 2001; Gupta et al, 2002; Thiele et al, 2004; Albera et al, 2005).

Effekte einer zellulären Therapie mit mesenchymalen Zellen wurden in Transplantationsversuchen bei fokaler Ischämie (Chen et al, 2000 & 2001a & 2003; Li et al, 2001b & 2002; Zhao et al, 2002; Lee et al, 2003; Borlongan et al, 2004; Esenault et al, 2008; Liu et al, 2008), experimentellem SHT (Lu et al, 2001; Mahmood, 2001a & 2001b; *reviewed* von Longhi et al, 2005), spinalem Trauma (Chopp et al, 2000; Sasaki et al, 2001; Hofstetter et al, 2002; Lee et al, 2003; Satake et al, 2004; Ankeny et al, 2004), Myokardinfarkt (Orlic et al, 2001a & 2001b; Toma et al, 2002; Yoon et al, 2005; Iso et al, 2007; *reviewed* von Minguell & Erices, 2006), Nierenschaden (Kale et al, 2003; Kunter et al, 2006; Qian et al, 2008), Diabetes (Hess et al, 2003; Lee et al, 2006), Pankreatitis (Cui & Bai, 2003) oder Lungenschaden (Ortiz et al, 2003; Ishizawa et al, 2004; Yamada et al, 2004; Loi et al, 2005; Bruscia et al, 2006) untersucht. Ebenso bei neurodegenerativen Erkrankungen erhofft man sich neue Therapieansätze. Für Morbus Parkinson (Nishino et al, 2000; Li et al, 2001a; Dezawa et al, 2004; Lu et al, 2005;

Offen et al, 2007; Levy et al, 2008), die Huntington-Erkrankung (Lescaudron et al, 2003), demyelinisierende ZNS-Erkrankungen (Akiyama et al, 2002a & 2002b) sowie der Niemann-Pick-Erkrankung (Jin et al, 2002) wurden Tiermodelle etabliert. Die Transfektion von MSC mit therapeutischen Genen erhöht den therapeutischen Effekt im Tierversuch (Kurozumi et al, 2004; Lu et al, 2005).

Grosses Interesse besteht auch hinsichtlich der möglichen Anwendung MSC als Vehikel zur Korrektur genetischer Defekte (Baxter et al, 2002), zur Verabreichung therapeutischer Proteine (Grove et al, 2002; Prockop et al, 2003; Prockop, 2004) oder onkolytischer Viren in der Krebstherapie (Pereboeva et al, 2000; Kromarova et al, 2006; Sonabend et al, 2008). Mit dem Ziel eines gentherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Hämophilie A wurde neben anderen Zelltypen in MSC die Möglichkeit der rekombinanten Expression von FVIII in immundefizienten Mäusen untersucht (Chuah et al, 1989 & 2000; Van Damme et al, 2003). Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von David Russel entwickelte eine gentherapeutische Behandlungsoption der seltenen Erbkrankheit *Osteogenesis imperfecta* (Chamberlain et al, 2004 & 2008). In unterschiedlichen Tiermodellen einer experimentell induzierten Muskeldegeneration demonstrierte eine Reihe von Arbeitsgruppen, dass markierte KM-Zellen nach Transplantation gezielt in das Verletzungsgebiet einwandern und zur Regeneration von Muskelfasern beitragen können (Ferrari et al, 1998; Gussoni et al, 1999; Bossolasco et al, 2004; Ojima et al, 2004; Doyonnas et al, 2005). Dass diese Erkenntnisse im Prinzip auf den Menschen übertragbar sind, zeigte ein Bericht über einen an der Duchenne Muskeldystrophie erkrankten Patienten, bei dem nach KM-Transplantation in kleiner Anzahl (0,5-0,9%) Zellkerne des Spenders in Muskelfasern identifiziert werden konnten (Gussoni et al, 2002). Andere Anwendungsgebiete MSC schliessen die Korrektur osseärer Defekte (Ohgushi et al, 2004) und die Wundheilung (Badiavas et al, 2003; Borue et al, 2004) mit ein. Auch bei der Entwicklung und Testung neuer Medikamente stellt die Zellkultur somatischer Stammzellen ein fortschrittliches Instrument dar.

Wenn auch die Erholung von funktionellen Defiziten in tierexperimentellen Studien dokumentiert wurde, liegen die dafür verantwortlichen spezifischen Mechanismen weitgehend im Dunkeln. So konnte etwa ein therapeutischer Benefit der Transplantation ohne Nachweis einer Umwandlung von Donorzellen innerhalb des entsprechenden Zielorgans nachgewiesen werden (Chopp et al, 2000; Balsam et al, 2004; Iso et al, 2007). Andererseits wurden Studien veröffentlicht, die kein signifikantes *Engraftment* und keine funktionelle Erholung in Verletzungsmodellen feststellen konnten (Wagers et al, 2004; Massengale et al, 2005; Fang et al, 2008). Es wird diskutiert, dass der experimentell induzierte Organschaden das *Engraftment* erhöht oder erst induziert (Herzog et al, 2006). Entsprechende Hinweise kommen auch aus dem Bereich der Organtransplantation (Kleeberger et al, 2002 & 2003).

Mittlerweile geht man sogar davon aus, dass die beobachteten funktionellen Verbesserungen nach KM-Transplantation in tierexperimentellen Verletzungsmodellen nicht ursächlich mit der Einwanderung transplantierte Zellen zusammenhängen. Eine zunehmende Zahl von Forschern favorisiert die Hypothese, dass die positiven Effekte durch die Freisetzung lokaler Mediatoren, die Vermittlung von Angiogenese und die Induktion endogener Neurogenese bedingt sind (Hofstetter et al, 2002; Zhao et al, 2002; Corti et al, 2004; Chen et al, 2004; Borlongan et al, 2004; Alison et al, 2006; Caplan & Dennis, 2006; Prockop, 2007; Parr et al, 2007). Die Suche nach den spezifischen Mechanismen von Organregeneration und funktioneller Erholung durch therapeutische Transplantation definierter KM-Zellpopulationen hat sich als neuer Forschungsgegenstand etabliert (Wang et al, 2002; Isele et al, 2007).

1.4.2. Erkenntnisse beim Menschen

Analog zu den Befunden im Tiermodell wurden Machbarkeit, Sicherheit und potenzielle Wirksamkeit einer Behandlung mit MSC in kleineren klinischen Studien geprüft. So zeigte sich bei Kindern mit *Osteogenesis imperfecta* nach allogener KM-Transplantation eine signifikante Verbesserung der Knochendichte in qualitativer wie quantitativer Hinsicht (Horwitz et al, 1999 & 2001 & 2002). Eine Kotransplantation MSC führte bei anderen genetischen Erkrankungen wie der metachromatischen Leukodystrophy und dem Hurler Syndrom in einigen Fällen zu einer messbaren Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit und der Knochendichte (Koç et al, 2002).

Im Bereich neurologischer Erkrankungen wurden positive Resultate nach Behandlung mit autologen MSC für Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (Mazzini et al, 2006 & 2008) und nach ischemischen Insult erzielt (Bang et al, 2005). Die zelltherapeutische Strategie wird derzeit ebenso als Behandlungsoption für Multiple-Sklerose-Patienten überprüft (Slavin et al, 2008). Experimentelle Ansätze zur Behandlung der Parkinsonerkrankung basieren bislang auf der Verwendung fetaler Zellen. In klinischen Studien am Menschen konnte gezeigt werden, dass durch intrastriatale Transplantation fetaler dopaminergischer Neuroblasten in Einzelfällen wesentliche Besserungen des Krankheitsbildes zu erzielen sind (Freed et al, 2001; Olanow et al, 2003). Insgesamt waren die Ergebnisse allerdings enttäuschend. Bei einem beträchtlichen Anteil von Patienten entwickelten sich andauernde Dyskinesien (Freed et al, 2001). Positive Resultate nach Zellersatztherapie mit fetalen Zellen wurden auch für die Chorea Huntington-Erkrankung berichtet (Freeman et al, 2000). Die Verwendung fetaler Zellen birgt jedoch nicht nur ethische Probleme. Die durchgeführten klinischen Studien haben auch Probleme hinsichtlich qualitativ standardisierter Aufbereitung und ausreichender Gewinnung von transplantierbaren Zellen offengelegt.

Vielversprechender ist gegenwärtig die klinische Anwendung MSC als supportive Therapie nach KM-Transplantation, nach Hochdosismotherapie bei hämatologischen Krankheitsbildern und zur Prävention und Behandlung einer *Graft-versus-host*-Reaktion. Präklinische Studien sprechend dafür, dass MSC das Outcome bei allogener KM-Transplantation durch die Unterstützung des *Engraftments* verbessern (Maitra et al, 2004). Die Koinfusion mesenchymaler und hämatopoietischer Stammzellen bei hämatologischen Krankheitsbildern konnte die hämatopoietische Erholung nach Hochdosismotherapie beschleunigen und wird in klinischen Studien erprobt (Koç et al, 2000; Lazarus et al, 2005). Die einzigartigen immunologischen Eigenschaften MSC machen sie ebenso zu interessanten Kandidaten einer immunmodulatorischen Therapie (Ryan et al, 2005; Le Blanc & Ringdén, 2007). Erste klinische Erfolge wurden mit der Transplantation MSC bei therapieresistenter *Graft-versus-host*-Erkrankung erzielt (Ringden et al, 2006; Le Blanc et al, 2008).

Für grosses Aufsehen und Diskussion sorgte 2001 die Transplantation körpereigener adulter Stammzellpopulationen bei Herzinfarktpatienten, ein Therapieansatz, der mittlerweile vielfach im Rahmen klinischer Studien beim Menschen evaluiert wurde (Strauer et al, 2002; Assmus et al, 2002; Stamm et al, 2003; Chen et al, 2004; Wollert et al, 2004; Fernandez-Aviles et al, 2004; Lunde et al, 2005; Erbs et al, 2005; Hofmann et al, 2005; Janssens et al, 2006; Zolnhöfer et al, 2006; Schächinger et al, 2006; Erbs et al, 2007; Ripa et al, 2007). Neben den bislang untersuchten Zellpopulationen scheinen klonogene MSC besonders vielversprechend zu sein (Zhang et al, 2006). Die Mehrzahl der bislang veröffentlichten Studienergebnisse dokumentierte eine bescheidene, aber signifikante Verbesserung der Herzleistung (Übersicht von Charwat et al, 2008). Eine norwegische Studie zeigte dagegen keine positiven Effekte der Stammzelltherapie (Lunde et al, 2005). Die Ursache des negativen Resultats wird durch Unterschiede in der Funktionalität der Zellen erklärt (Seeger et al, 2007). Das therapeutische Potential einer autologen Transplantation von KM-Zellen wurde ebenso bei arterieller Verschlusskrankheit (Tateishi-Yuyama et al, 2002), chronischer koronarer Herzerkrankung (Perin et al, 2004; Erbs et al, 2005; Assmus et al, 2005; Strauer et al, 2005;

Fuchs et al, 2006; Stamm et al, 2007) und dilatativer Kardiomyopathie (Fischer-Rasokat et al, 2005) untersucht.

Eine Biotechnologiefirma, die sich auf die Anwendung MSC spezialisiert hat, treibt die Erprobung ihres Produkts Prochymal™, eines intravenösen Präparats gesunder Spender, in klinischen Studien mit den Indikationen *Graft-versus-host*-Erkrankung und Morbus Crohn voran. Weitere klinische Erprobungen umfassen die Behandlung von Patienten nach Myokardinfarkt, Patienten mit Typ-1-Diabetes, COPD und orthopädischen Erkrankungen (laut Unternehmensinformation unter www.osiristx.com).

1.5. Zusammenfassung

MSC zeigen typische Eigenschaften von Stammzellen: sie proliferieren klonal und besitzen ein multipotentes Differenzierungspotential. Die Isolation erfolgt über Plastikadhärenz; phänotypisch zeichnen sie sich durch die Expressierung charakteristischer Oberflächenmarker und die Abwesenheit typischer hämatopoetischer Oberflächenantigene aus. Die aus dem KM isolierte und *in-vitro* expandierte Zellpopulation muss als heterogen betrachtet werden.

Zahlreiche *in-vitro*-Untersuchungen belegen die beeindruckende Plastizität MSC. Obwohl für MSC die Expression unterschiedlicher, für Neurone typischer Marker demonstriert wurde, bleibt nach wie vor unklar, ob diese neuron-ähnlichen Zellen tatsächlich Charakteristiken funktioneller Neurone aufweisen und in Nervenzellverbände integriert werden. Bislang wurde nur von wenigen Forschergruppen ein Nachweis für die funktionelle Aktivität der *in-vitro* differenzierten Nervenzellen erbracht (Kohyama et al, 2001).

Hinsichtlich klinischer Anwendung befinden sich therapeutische Strategien mit adulten Stammzellen in einem Anfangsstadium. Es konnte gezeigt werden, dass Zellersatztherapie im Prinzip funktioniert und dass sie in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen einen gangbaren Weg darstellt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt muss man davon ausgehen, dass positive Effekte der stammzellbasierten Therapie nicht nur - wie ursprünglich proklamiert - Transdifferenzierungsprozessen zuzuschreiben sind, sondern ebenso Ergebnis von Zellfusion, Vermittlung von Angiogenese und Freisetzung lokaler Mediatoren sind. Die klinische Anwendung adulter Stammzellen an grösseren Studienpopulationen zur Therapie des Myokardinfarkts hat gezeigt, dass das Verfahren mit Nebenwirkungen verbunden sein kann. Mögliche Langzeitfolgen sind derzeit noch nicht abzuschätzen. Bevor sich die Behandlung mit mesenchymale Stammzellen als Therapieverfahren etablieren kann, besteht daher noch grosser Forschungsbedarf.

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

MSC gelten als aussichtsreiche Kandidaten für neue zellbasierte und regenerative Therapien. Für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen ist eine kontrollierte und standardisierte Expansion und neuronale Differenzierung humaner MSC von ausserordentlicher Bedeutung, um eine möglichst homogene Population von Vorläuferzellen oder voll differenzierter Zellen zu gewinnen.

Seit der Entdeckung der Plastizität mesenchymaler KM-Zellen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass frühe und reife neuronale Zellen aus mesenchymalen Stromazellen des KM *in-vitro* gewonnen werden können. Die Schwierigkeit bei der Beurteilung der unterschiedlichen Studienergebnisse ist der Umstand, dass sich Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen erheblich unterscheiden. Dies macht einen Vergleich der verwendeten Protokolle schwierig. Die Frage, in welchem Ausmass die unterschiedlichen Komponenten der Zellkultur die neuronale Differenzierung MSC beeinflussen, lässt sich auf dieser Datenbasis kaum beantworten. Eine breit angelegte Untersuchung der Effekte unterschiedlicher Kulturbedingungen hinsichtlich neuronaler Differenzierung wurde bislang nicht unternommen. Unser Ziel war daher eine systematische Analyse der Effekte unterschiedlicher Kulturbedingungen aber auch der Herkunft der MSC hinsichtlich ihres Potentials, einen neuronalen Phänotyp zu induzieren. In aufeinanderfolgenden Versuchsreihen sollte der Einfluss verschiedener Kulturmedien, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie die Bedeutung von extrazellulärer Matrix und Serumkonzentration hinsichtlich Steuerung von Proliferation und neuronaler Differenzierung humaner MSC geklärt werden. Ausgehend von einer unter identischen Kulturbedingungen gewonnenen Ausgangspopulation wurden die Kulturbedingungen einzelner Experimente mit einem Standardinduktionsmedium verglichen. Der Nachweis einer neuronalen Zelldifferenzierung sollte durch immunhistochemische Methoden am Ende der jeweiligen Versuchsreihe überprüft werden. Während des laufenden Versuchs wurden die einzelnen Versuchskammern mit ihren definierten Kulturbedingungen lichtmikroskopisch beurteilt. Beobachtet wurden jeweils Proliferation und morphologische Veränderung. Der Effekt der Versuchsbedingung hinsichtlich Proliferation der Zellen sollte am Ende des Versuchs quantifiziert werden. Dazu wurde ein einfacher Proliferations-Index berechnet. Die Auswertung des immunhistochemischen Ergebnisses erfolgte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. Die statistische Analyse der erhaltenen Daten sollte so gewählt werden, dass sich die Effekte der einzelnen Experimente und ihrer definierten Kulturbedingungen quantitativ gegenüber der Standardkulturbedingung abschätzen lassen.

Mit den Ergebnissen der systematischen Untersuchung sollte schliesslich ein effektives Protokoll etabliert werden, das einen möglichst hohen Anteil neuronal differenzierter Zellen aufweist.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte, Gebrauchsmaterialien und Software

Laminar-Flow-Bench	Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Laborwaage	Fa. Sartorius AG, Goettingen
Brutschrank	Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Kühlkombination	Fa. Siemens AG, München
Zentrifugen	Fa. Eppendorf AG, Hamburg (klein); Fa. Hettich AG, Bäch, CH (gross)
Vortex	Fa. neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
pH-Meter	Fa. Hanna Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Island, USA
Einmalpipetten	Fa. Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, über Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Eppendorfröhrchen	Fa. Dianova GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen Eppendorf	Fa. Dianova GmbH, Hamburg
Zellsieb (70µm)	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zellschaber	Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Fa. Life Technologies, jetzt Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Kulturflascs Nunclon 80cm ²	Fa. Chemicon International Inc., Temecula, Kalifornien, USA
Kulturflascs Nunclon 25cm ²	Fa. Chemicon International Inc., Temecula, Kalifornien, USA
Permanox™, 4 well (Lab-TEK™ Chamber Slide™ System)	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falcon Tubes 50ml	Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Falcon Tubes 15ml	Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Zählkammer Neubauer	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Cryoröhrchen (1,8 ml)	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Einfrierbox	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop Olympus CK40	Fa. Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
Kamera Vision	Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen
KS 300 Software	Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzeinrichtung	Fa. Micro-Optik, Witten
SPSS 10.0	Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA
Office 2003 Service Pack 3	Fa. Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Adobe Reader 9.3.2	Fa. Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA

3.1.2. Chemikalien

Histopaque® (1.077 g/mL bei 25 °C)
Trypanblau-Lösung (0,4%)

Paraformaldehydlösung (4%)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Life Technologies, jetzt Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fa. Merck KGaA, Darmstadt

3.1.3. Gebrauchslösungen

Puffer

Phosphat gepufferte Saline (PBS)
Dublecco's Phosphat-gepufferte Saline (mit MgCl₂ und CaCl₂) (DPBS)
Tris-gepufferte Saline (20mM, pH 7,4)
Borsäure (Tabletten)

Hanks' balanced salt solution (HBSS) (ohne CaCl₂/ MgCl₂)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Natrium-Borat-Puffer (0,15M, pH 8,3):
4,63 Gramm Borsäure auf 0,5 Liter Aqua dest.
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Andere

Rinderserumalbumin-Lösung (0,1%)
Ziegen-Normalserum-Lösung (10%)
Aqua dest.
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%)
Glycerol
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Dianova GmbH, Hamburg
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

3.1.4. Medien und Supplemente für die Zellkultur

Medien

MEM
DMEM/F12

MEM *Alpha Modification*

DMEM (*no glucose*)
Neurobasal™

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Gibco/Life Technologies, jetzt Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fa. Gibco/Life Technologies, jetzt Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Gibco/Life Technologies, jetzt Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

Zusätze

Fetales Kälberserum
(Charge 098H8407)
L-Glutamin (200mM)
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strept.)

Glukose (100g/L)

Heparin
B27-Supplement (50x)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
(10000 units/ml Pen., 10 mg/ml Strept.)
Fa. Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Fa. Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

N2-Supplement (100x)

Fa. Invitrogen Corporation, Carlsbad,
Kalifornien, USA

Wachstumsfaktoren

FGF-2 (rekombinant)

FGF-8b (Maus)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Fa. R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota,
USA

SHH (rekombinant Maus)

Fa. R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota,
USA

BDNF (rekombinant)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

NT-3 (rekombinant)

Fa. Invitrogen Corporation, Carlsbad,
Kalifornien, USA

3.1.5. Materialien für die Beschichtung

Poly-L-Lysin 70-150kD

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Poly-L-Ornithin

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Laminin (Maus-Sarkom)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Fibronectin (Rind)

Fa. Invitrogen Corporation, Carlsbad,
Kalifornien, USA

3.1.6. Materialien für die Immunfluoreszenz

Triton® X-100

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

DAPI

Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Fluoromount-G™

Fa. BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH,
Eching

Deckgläschen

Fa. Nunc GmbH & Co. KG, jetzt Thermo Fisher
Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Nagellack

Handelsübliches Produkt

Primärantikörper

Anti-β-III-Tubulin (aus der Maus)

Fa. Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen

Sekundärantikörper

TRITC-Ziege anti Maus IgG (H+L)

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.,
West Grove, Pennsylvania, USA, über Dianova
GmbH, Hamburg

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte der Präparation und Behandlung der Zellen wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt. Pipettenspitzen und Glaswaren wurden bei feuchter Hitze von 121°C und einem Dampfdruck von 200 kPa 20 min. lang autoklaviert. Die Werkbank wurde regelmäßig mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Präparation der humanen mesenchymalen Knochenmarkszellen

Humane mesenchymale Zellen wurden aus Restmaterial von Spendern bei der „Aktion Knochenmarkspende Bayern“ bezogen. Die Zellen wurden aus verbliebenen Resten in Filter

und Sammelbeutel gewonnen, die aus technischen Gründen für die KM-Konserve nicht verwendet und in der Regel verworfen werden. Die Verwendung des Restmaterials erfolgte nach Aufklärung und Einverständnis des Spenders. Die ethische Unbedenklichkeit wurde durch die Ethikkommission der Fakultät bestätigt.

Die mesenchymalen Zellen wurden in Anlehnung an etablierte Protokolle über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Nach Spülen der Sammelbeutel und Filter mit MEM-Medium/20% FCS wurden in 50ml *Tubes* jeweils 30ml der gewonnenen KM-Flüssigkeit auf 15 ml Ficoll (Histopaque®) gegeben. Dabei wurden grobe Gewebereste durch eine 70µm-Nylonsieb zurückgehalten. Nach Zentrifugieren (400 g, 20 min.) konnte ein *Interphase* gewonnen werden, das in neuen *Tubes* gesammelt wurde. Die darin enthaltenen Zellen wurden einem Spülvorgang unterzogen, um toxische Reste der Ficoll-Lösung auszuwaschen. Die Zellsuspension wurde dabei insgesamt dreimal mit MEM-Medium/20% FCS versetzt und anschließend zentrifugiert (400 g, 10 min.). Der Überstand wurde mit einer sterilen Einmalpipette entfernt, das verbliebene Zellpellet mit MEM-Lösung/20% FCS resuspendiert. Im letzten Spülvorgang wurden die Zellen zur Bestimmung der Zellzahl mit 1ml MEM/20% FCS-Lösung resuspendiert. Die gewonnene Zellzahl betrug je nach Ausgangsmaterial zwischen 1×10^5 bis 1×10^7 Zellen. Die so aufbereiteten Zellen wurden in Proliferationsmedium (MEM/20 % FCS) als Primärkultur angezüchtet.

Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der entsprechenden Zellsuspension in ein Eppendorfröhrchen gegeben und mit 40 µl 0,4% Trypanblau-Lösung vermischt. Anschließend wurden 10 µl der Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl in den jeweiligen Quadranten der Zählkammer an einem Invertmikroskop bei hundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast-Verfahren bestimmt. Dabei wurden nur die nicht gefärbten, lebenden Zellen ausgezählt. Die Zellzahl in der Zellsuspension errechnete sich nach der Formel:

Zellzahl in 1ml Zellsuspension = (Mittelwert der Quadranten x 5) x 10^4 Zellen

Kultivierung und Anreicherung der mesenchymalen Zellen über Adhärenz

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Auswahl der *Flascs* erfolgte nach der vorhandenen Zellmenge; als initiale Zelldichte wurde ein Wert von $1 \times 10^7/75 \text{ cm}^2$ bzw. $3 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ angestrebt. Die Selektion und Anreicherung mesenchymaler Zellen erfolgte mittels Kunststoff-Adhäsion am Kulturboden. Nach 48h in Kultur wurde das Medium komplett durch frisches Proliferationsmedium ersetzt. Beim Abgießen des Mediums wurden nicht-adhärente Zellen mitentfernt. Während der weiteren Kultivierung wurde dieser Vorgang alle zwei Tage wiederholt. Proliferation und Zelldichte wurden mikroskopisch beobachtet. Waren die Zellen nahezu konfluiert, wurden sie abgehoben und nach Bestimmung der Zellzahl in neuer Passage weiterkultiviert. Für die hier durchgeführten Versuche wurden Zellen der zweiten Passage verwendet.

Abheben, Aliquotieren und Aufbewahren im Stickstofflager

Die Primärkulturen konfluieren je nach anfänglicher Zelldichte nach 7-14 Tagen. Zellen, die keine Verwendung für vorbereitete Versuche fanden, wurden nach Bestimmung der Zellzahl zur Aufbewahrung im Stickstofflager aliquotiert. Nachdem das Kulturmedium aus dem *Flasc* abgegossen war, wurde die Zellkultur zunächst mit HBSS gespült, um unerwünschte Reste von Kälberserum zu entfernen. Anschließend wurde 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung ($0,2 \text{ ml/cm}^2$) für eine Einwirkzeit von einer Minute der Zellkultur zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die adhären Zellen zusätzlich mechanisch von ihrer Unterlage

abgehoben. Die enzymatische Aktivität des Trypsins wurde schließlich durch Dekantieren der Zellsuspension in ein bereitgestelltes Röhrchen mit fünffacher Menge MEM/20%FCS gestoppt. Nach Zentrifugieren (400 g, 5 min.) wurde der Überstand mit der verdünnten Trypsinlösung abgehoben und die Zellen in Proliferationsmedium resuspendiert. Dann wurde die Zellzahl bestimmt.

Für das Aufbewahren der Zellen im Stickstofftank wurden 1×10^6 - 1×10^7 Zellen in 1 ml Proliferationsmedium mit 10% DMSO versehen und in Cryoröhrchen überführt. In einer Einfrierbox, die mit Isopropanol gefüllt ist, wurden die Zellen mit einer Abkühlrate von etwa 1°C/min. schonend auf -70°C heruntergekühlt, bevor sie zur Verwahrung in den Stickstofftank gegeben wurden.

Auftauen der Zellen

Die cryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C rasch aufgetaut, in vorgewärmtes Medium aufgenommen und bei 400 g für 5 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in Proliferationsmedium resuspendiert und ausgesät.

3.2.2. Kulturmedien

Als Proliferationsmedium und Standardkulturbedingung wurde das Medium MEM mit 20% FCS verwendet.

Zur Herstellung von 50 ml Medium MEM wurden verwendet:

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums MEM (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
MEM	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%

Für den antibiotischen Schutz der Zellkultur ergibt sich dadurch eine Aktivität und Konzentration von 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin.

Serum enthält eine komplexe Mischung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderer biologisch aktiver Substanzen. Dies macht Serum zum universell einsetzbaren Supplement in der Zellkultur; allerdings variiert die Zusammensetzung je nach Herkunft, Ernährungssituation und Entnahmebedingungen. Diese Schwankungen machen in vielen Fällen die Austestung einer geeigneten Charge notwendig. In unserem Fall wurde für alle Versuchsreihen fötales Kälberserum einer einzigen Charge verwendet, das für die Kultivierung mesenchymaler Zellen vom Hersteller vorgetestet wurde. Das Serum war thermisch inaktiviert (+56°C, 30 min.) und auf Mykoplasmen, bakterielle L-Formen und Viruskontamination geprüft.

In den Versuchsreihen wurden zusätzliche Medien für die Differenzierungskultur verwendet:

Das Kulturmedium MEM mit einem hohen Glukoseanteil (MEM_glc)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums MEM_glc (50ml). Für das Medium ergibt sich eine Glukosekonzentration von 6 mg/ml.

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
MEM	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%
Glukose	3 ml	6%

Das Kulturmedium MEM mit Heparin (MEM_hep)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mediums MEM_hep (50ml). * Heparin wurde in einer Konzentration von 2µl/ml Kulturmedium zugegeben.

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
MEM + Heparin*	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%

Das Kulturmedium DMEM/F12 mit dem Supplement B27 (F12_B27)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 4: Zusammensetzung des Mediums F12_B27 (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
DMEM/F12	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%
B27	0,5 ml	1%

Das Kulturmedium DMEM/F12 mit dem Supplement N2 (F12_N2)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums F12_N2 (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
DMEM/F12	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%
N2	0,5 ml	1%

Das Kulturmedium MEM *Alpha Modification* mit Nukleosiden (MEM_nuk)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mediums MEM_nuk (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
MEM_nuk	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%

Das Kulturmedium DMEM (DMEM)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mediums DMEM (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
DMEM	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%

Das Kulturmedium Neurobasal™ mit dem Supplement B27 (Neurob_B27)
Zur Herstellung von 50 ml Medium wurden verwendet:

Tabelle 8: Zusammensetzung des Medium Neurob_B27 (50ml)

Zutat/Ausgangsmaterial	Menge/Konzentration	Anteil in Prozent
Neurobasal™	40 ml	80%
FCS	10 ml	20%
L-Glutamin	1 ml	2%
Pen./Strept.	0,5 ml	1%
B27	0,5 ml	1%

3.2.3. Zellkultur-Supplemente

Zum Teil wurden den Medien gebrauchsfertige Supplemente für die Zellkultur zugegeben. Dabei handelte es sich um das B27- und N2-Supplement. N2 (Tabelle 9) wurde als serumfreier Zusatz zur Wachstumsförderung neuronaler Zellen designt und erwies sich als effektiv in der Anzüchtung diverser Tumorzell-Linien neuronaler Herkunft (Bottenstein & Sato, 1979). B27 ist ebenso ein serumfreies Supplement und wurde ursprünglich von G. J. Brewer zur Langzeit-Kultivierung hippocampaler Neurone entwickelt (Brewer et al, 1993). Es enthält eine optimierte Konzentration verschiedener Hormone, Aminosäuren, Vitamine und antioxidativer Agenzien. Die genaue Zusammensetzung wurde vom Hersteller aus patentrechtlichen Gründen nicht genannt. Beide Zellkulturzusätze finden breite Anwendung in Protokollen für neuronale Zellkulturen.

Tabelle 9: Zusammensetzung des N2-Supplements (laut Hersteller)

Komponente	Molekulargewicht	Molarität (mM)	Konzentration (mg/L)
humanes Transferrin	10000	1.000	10000
Insulin (rekombinant)	58077	0.009	500
Progesteron	0.63	1.000	0.63
Putrescin	1611	1.000	1611
Selenit	0.52	1.000	0.52

Die Endkonzentrationen im N2-supplementierten Medium waren schliesslich 0,1 mg/ml Transferrin, 5 µg/ml Insulin, 6,3 ng/ml Progesteron, 16 µg/ml Putrescin und 0,52 ng/ml Selenit.

3.2.4. Beschichtung mit extrazellulärer Matrix

In der vorliegenden Arbeit wurden sterile Permanox™ OT im 4-well-Format verwendet. Die Kulturoberfläche beträgt 1,7 cm². Die OT wurden in zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Matrixmaterialien beschichtet. Es wurden verwendet: Poly-L-Lysin, Poly-L-Ornithin, Laminin und Fibronectin. Nach dem Beschichtungsvorgang wurden die OT teils getrocknet (dry), teils wurde das Kulturmedium unmittelbar nach dem Spülvorgang zugegeben (not_dry).

Die Arbeitsschritte zur Beschichtung der OT waren im Einzelnen:

Beschichtung mit Poly-L-Lysin (PLL):

Gelöstes PLL wurde mit Aqua dest. zu einer Gebrauchslösung von 0,1 mg/ml verdünnt. Zur Beschichtung wurden 100 µl/well der Lösung verwendet.

Tabelle 10: Arbeitsschritte für die Beschichtung PLL_dry (RT = Raumtemperatur)

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit PLL-Gebrauchslösung
0+5 min.	PLL-Gebrauchslösung abheben
0+5 min.	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+10 min.	> 2 h Trocknen bei RT

Beschichtung mit Poly-L-Ornithin (PORN):

Zur Herstellung der PORN-Gebrauchslösung wurde PORN zunächst in 1 ml Aqua. dest. gelöst und anschließend mit Na-Borat-Puffer (pH 8,3) auf eine Konzentration von 0,25 mg/ml verdünnt. Da der Puffer unter unsterilen Bedingungen hergestellt wurde, musste die Gebrauchslösung steril filtriert werden. Zur Beschichtung wurden 100 µl/well der Lösung verwendet.

Tabelle 11: Arbeitsschritte für die Beschichtung PORN_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit PORN-Gebrauchslösung
0+12 h	PORN-Gebrauchslösung abheben
0+12 h	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+12 h	> 2 h Trocknen bei RT

Kombinierte Beschichtung mit Poly-L-Lysin und Poly-L-Ornithin (PLL_PORN):

Für die kombinierte Beschichtung wurden jeweils 100 µl/well der PLL- und PORN-Gebrauchslösung verwendet.

Tabelle 12: Arbeitsschritte für die Beschichtung PLL_PORN_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit PLL-Gebrauchslösung
0+5 min.	PLL abheben
0+5 min.	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+10 min.	> 2 h Trocknen bei RT
0+2 h	Beschichten mit PORN-Gebrauchslösung
0+14 h	PORN-Gebrauchslösung abheben
0+14 h	5 x Spülen mit Aqua. dest.
0+14 h	> 6 h Trocknen bei RT

Beschichtung mit Laminin (LAM):

Zur Herstellung der LAM-Gebrauchslösung wurde LAM mit HBSS zu einer Konzentration von 80 µg/ml verdünnt. Zur Beschichtung wurden 100 µl/well der Gebrauchslösung verwendet.

Tabelle 13: Arbeitsschritte für die Beschichtung LAM_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit LAM-Gebrauchslösung
0+5 h	LAM-Gebrauchslösung abheben
0+5 h	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+5 h	> 2 h Trocknen bei RT

Kombinierte Beschichtung mit Poly-L-Ornithin und Laminin (PORN_LAM):

Für die kombinierte Beschichtung mit Beschichtung mit PORN und LAM wurden die OT sequentiell mit 100 µl/well der jeweiligen Gebrauchslösung beschichtet.

Tabelle 14: Arbeitsschritte für die Beschichtung PORN_LAM_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit PORN-Gebrauchslösung
0+12 h	PORN abheben
0+12 h	5 x Spülen mit Aqua. dest.
0+12 h	Beschichten mit LAM-Gebrauchslösung
0+17 h	LAM-Gebrauchslösung abheben
0+17 h	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+17 h	> 2 h Trocknen bei RT

Beschichtung mit Fibronectin (FN):

Zum Herstellen der FN-Gebrauchslösung wurde das Rinder-FN mit DPBS zu einer Konzentration von 250 µg/ml verdünnt. Zur Beschichtung wurden 100 µl/well der Gebrauchslösung verwendet.

Tabelle 15: Arbeitsschritte für die Beschichtung FN_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit FN-Gebrauchslösung
0+5 min.	FN-Gebrauchslösung abheben
0+5 min.	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+10 min.	> 2 h Trocknen bei RT

Kombinierte Beschichtung mit Fibronectin und Laminin (FN LAM):

Die kombinierte Beschichtung mit FN und LAM wurde aus den jeweiligen Gebrauchslösungen hergestellt. Zur Beschichtung wurden jeweils 100 µl/well der Gebrauchslösung verwendet.

Tabelle 16: Arbeitsschritte für die Beschichtung FN_LAM_dry

Zeit	Aktion
0	Beschichten mit FN-Gebrauchslösung
0+5 min.	FN-Gebrauchslösung abheben
0+5 min.	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+10 min.	Beschichten mit LAM-Gebrauchslösung
0+5 h	LAM-Gebrauchslösung abheben
0+5 h	2 x Spülen mit Aqua. dest.
0+5 h	> 2 h Trocknen bei RT

3.2.5. Induktion der neuronalen Differenzierung

In insgesamt 5 Versuchsreihen wurden die Effekte von Medium, Serumanteil, Beschichtung und der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf neuronale Differenzierung und Proliferation humaner MSC untersucht (Tabelle 17). Alle Versuche wurden mit Zellen der zweiten Passage durchgeführt. Die initiale Zelldichte betrug in den einzelnen Experimenten $2,5 \times 10^3$ Zellen/well. Je nach Fragestellung waren die Permanox™-OT beschichtet oder unbeschichtet. Die Auswahl der Wachstumsfaktoren, des Serumanteils und des Kulturmediums richtete sich nach dem Untersuchungsgegenstand. Jede Versuchsreihe wurde durch eine Negativkontrolle (Standardmedium, kein Wachstumsfaktor) intern validiert. In der abschließenden fünften Versuchsreihe wurden im Sinne eines "Best off" verschiedene Einflussfaktoren miteinander kombiniert.

Die verwendeten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren waren im einzelnen: *fibroblast growth factor-2* (FGF-2, 10 ng/ml), *neurotrophin 3* (NT-3, 1 ng/ml), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF, 10 ng/ml), *fibroblast growth factor-8b* (FGF-8b, 10 ng/ml) und *sonic hedgehog* (SHH, 66 ng/ml). Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Jeden zweiten Kulturtag wurde das Medium komplett durch frisches Medium ersetzt; entsprechende Wachstumsfaktoren wurden erneut zugegeben. Der Verlauf der Zellkultur wurde lichtmikroskopisch beurteilt. Nach sechs Kulturtagen wurde die Differenzierungskultur gestoppt und der immunhistochemischen Auswertung zugeführt.

Tabelle 17: Übersicht der fünf Versuchsreihen zur neuronalen Differenzierung und Proliferation humaner MSC.
GF = Wachstumsfaktor.

Studie	Fragestellung	Medium	Beschichtung	FCS%	GF	Anzahl Exp.
1	Medienvergleich	MEM MEM_gluc MEM_nuk MEM_hep DMEM F12_B27 F12_N2 Neurob_B27	Ohne Beschichtung	20%	FGF-2	5
2	Neue GF	MEM	Ohne Beschichtung	20% 1%	FGF-2 FGF-8b SHH	5
3	Beschichtung	MEM	PLL PLL_PORN_dry PLL_PORN_not_dry PORN_LAM_dry PORN_LAM_not_dry FN_dry FN_LAM_dry FN_LAM_not_dry PORN_dry PORN_not_dry LAM_dry	20%	FGF-2	5
4	Serumanteil	MEM F12	Ohne Beschichtung	20% 5% 1% 0%	FGF-2	5
5	"Best off"	MEM	PLL_PORN_dry	1%	FGF-2 FGF-8b SHH NT-3 BDNF	6

3.2.6. Diagnostische Methoden

Zur Beurteilung der neuronalen Differenzierung wurde das neuronale Protein β -III-Tubulin immunhistochemisch nachgewiesen. Die Proliferation wurde anhand der Zellzahl pro Gesichtsfeld bei der mikroskopischen Auswertung bestimmt.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie bedient sich des Antigen-Antikörper-Prinzips. Der Antikörper für ein bestimmtes Antigen wird in einer Tierart (z.B. Maus) hergestellt. In unserem Protokoll wurden ungekoppelte Primärantikörper mit einem sekundären fluoreszierenden Antikörper markiert, der sich gegen die Tierart richtete, in welcher der primäre Antikörper hergestellt wurde.

Um die optimalen Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper für die immunhistochemische Auswertung zu ermitteln, wurden die Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen an MSC getestet. Eine Verdünnungsstufe von 1:800 des Primärantikörpers Anti- β -III-Tubulin (IgG Maus) und von 1:200 des fluoreszierenden Sekundärantikörpers TRITC-anti-Maus zeigte einen ausreichenden Färbeerfolg. Die genannten Verdünnungsstufen wurden für die nachfolgenden Versuchsreihen ausgewählt. Zur Validierung der immunhistochemischen Methode für unsere Fragestellung wurde der Primärantikörper Anti- β -III-Tubulin (IgG Maus) zudem in der ausgewählten Verdünnung an der neuralen Stammzell-Linie C17.2

erprobt. Dabei konnte eine farbintensive Darstellung β -III-Tubulin-positiver neuronaler Stammzellen erzielt werden.

Ferner führten wir in Vorversuchen auch Färbungen durch, bei denen der Inkubationsschritt mit dem jeweiligen Primärantikörper ausgelassen wurde. Bei diesen Färbungen fand sich kein Immunfluoreszenzsignal, so dass wir unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers für unsere Versuche ausschliessen können.

Es folgt der Ablauf einer immunhistochemischen Färbung am Beispiel des Antikörpers Anti- β -III-Tubulin (IgG Maus):

Tabelle 18: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung. Fc-Block: Das Normalserum der Spezies, aus der der zweite Antikörper stammte (hier: Ziege), wurde mit PBS/0,3% Triton X 1:10 verdünnt und die OT damit 2h blockiert.

Arbeitsschritt	Medium/Puffer	Menge	Zeit	Temperatur
Waschen	PBS	250 μ l/well	kurz	RT
Fixieren	4% PFA	250 μ l/well	20 min.	4° C
Waschen	PBS	250 μ l/well	3 x 3 min.	RT
Blockieren unspezifischer Fc-Bindungsstellen	Fc-Block	250 μ l/well	2 h	RT
Waschen	PBS	250 μ l/well	2 x 3 min.	RT
Inkubation mit Primärantikörper	β -III-Tubulin 1:800 in PBS, 10% NGS	200 μ l/well	2 h	RT
Waschen	PBS	250 μ l/well	3 x 5 min.	RT
Inkubation mit Sekundärantikörper	TRITC- <i>anti mouse</i> 1:200 in PBS, 10% NGS	200 μ l/well	30 min.	RT
Waschen	PBS	250 μ l/well	2 x 5 min.	RT
Kernfärbung	DAPI 10 μ g/ml	200 μ l/well	5 min.	RT
Waschen	PBS	250 μ l/well	1 x 1 min.	RT
Waschen	Aqua dest.	250 μ l/well	2 x 1 min.	RT
Abheben und Eindeckeln der OT	Fluoromount-G, Deckgläschen Nagellack	2-3 Tropfen pro OT		RT
Trocknen/Lagerung			über Nacht	RT, lichtarm

Um eine Konservierung der Fluoreszenz zu gewährleisten, wurden die OT im Dunkeln aufbewahrt.

Lichtmikroskopische Auswertung und photographische Dokumentation

Die OT der Versuchsreihen wurden am Mikroskop B60 der Firma Olympus betrachtet. Die Anregung des Farbstoffs erfolgte mit einer Fluoreszenzlampe und entsprechendem Filter (TRITC: Absorptionsmaximum 550 nm, Emissionsmaximum 570 nm). Für die Auswertung der Präparate wurden 10-15 Gesichtsfelder bei 100facher Vergrößerung zufällig ausgewählt. Photographiert wurde mit einer digitalen Kamera (Vision) der Firma Zeiss. Die Bildausschnitte wurden anschliessend mit Hilfe der KS 300 Software der Firma Zeiss dokumentiert. Zur Beurteilung der neuronalen Differenzierung wurden die Bildausschnitte der immunhistochemischen Färbung nach Färbeintensität beurteilt und nach Abstufungsgraden bewertet: Eindeutig fluoreszenzpositive Zellen wurden als "B3Plus" (b3+) bewertet, intermediär positive Zellen als "B3Null" (b30) und fluoreszenznegative Zellen als "B3Minus" (b3-). Der Anteil der jeweiligen Zellfraktion wurde in Prozent ermittelt. Lediglich die als eindeutig

fluoreszenzpositiv gewerteten Zellen wurden als neuronal differenzierte Zellen anerkannt. Zur Beurteilung der Proliferation wurde für das jeweilige Experiment die Zellzahl pro Gesichtsfeld (= Proliferations-Index, PI) am Ende des Versuchs ermittelt. Der Wert ergibt sich aus der Division der Gesamtzellzahl in den untersuchten Bildausschnitten durch die Anzahl der untersuchten Bildausschnitte. Um den additiven oder inhibierenden Einfluss der Kulturbedingungen auf die Proliferation zu beurteilen, wurde in der statistischen Auswertung der PI gegenüber der Negativkontrolle bewertet. Der Wert kann auch in Beziehung zur initialen Zellzahl gesetzt werden. Um die Bedingung zu Versuchsbeginn zu beurteilen, wurden zwei Kulturflächen unmittelbar nach Zellaussaat lichtmikroskopisch untersucht. Dabei ergab sich für die initiale Zelldichte von $2,5 \times 10^3$ Zellen ein Mittelwert von 5,3 Zellen pro Gesichtsfeld. Während des laufenden Versuchs wurde das Kulturmedium im Durchschnitt nach 48h ersetzt und die Wachstumsfaktoren erneut zugegeben. Bei dieser Gelegenheit wurden die einzelnen Versuchskammern mit ihren jeweils definierten Kulturbedingungen lichtmikroskopisch beurteilt. Beobachtet wurden jeweils Proliferation und morphologische Veränderung. Zur Beurteilung der Proliferation wurde nach dem visuellen Eindruck des Untersuchers die Zelldichte gegenüber der initialen Zellzahl nach 4 Stufen bewertet:

- mässige Proliferation (+)
- starke Proliferation (++)
- Proliferation inhibierend (-)
- Proliferation stark inhibierend (--)

Die mikroskopische Auswertung der morphologischen Veränderung der Zellen erfolgte in ähnlicher Weise: Zellen mit der Ausbildung von neuritischen, zytoplasmaarmen Fortsätzen, die länger als der Zellkörperdurchmesser waren, wurden als Zellen mit neuronaler Morphologie gewertet. Nach Ausprägungsgrad der charakteristischen neuronalen Zellmorphologie ergaben sich zwei Bewertungsstufen:

- neuronale Morphologie mässig ausgeprägt (Δ)
- neuronale Morphologie stark ausgeprägt (\blacktriangle)

3.3. Statistik

3.3.1. Syntax des statistischen Modells

Die Auswertung erfolgte mit multivariater Varianzanalyse. Die verwendeten statistischen Modelle haben die folgende Struktur gemeinsam:

$$Y = \text{INTERCEPT} + \text{CELL} + \dots \text{CO-FACTORS} \dots + \text{ERROR}; \quad \text{ERROR} \sim N(0, \sigma^2).$$

Y ist der multivariate Vektor der abhängigen Variablen (b3+, b30, b3-, PI).

INTERCEPT ist der "Y-Achsenabschnitt" oder "*Grand Mean*" des linearen Modells. Er hat keine sachwissenschaftliche Bedeutung, war aber immer signifikant von Null verschieden und ist daher für eine korrekte Modell-Anpassung obligat.

CELL ist die untersuchte Zell-Linie. Da sich die Zell-Linien in der globalen Auswertung (Modell 1, s.u.) signifikant in ihrer Antwort auf die experimentellen Bedingungen unterschieden, wurden bewusst alle Auswertungen hinsichtlich des Ko-Faktors "Zell-Linie" adjustiert, unabhängig von der Signifikanz in den verschiedenen Auswertungen. Da Zell-Linie 13 am häufigsten verwendet wurde, wurde diese stets als Bezugsstufe gewählt, mit Ausnahme von Modell 4, in der Zell-Linie 13 nicht verwendet wurde. In der globalen Auswertung aller Versuchsreihen (Modell 1) unterschied sich Zell-Linie 7 von allen Zell-Linien, die in Versuchsreihe 1 verwendet wurden, am wenigsten von Zell-Linie 13. Daher wurde im Modell 4 die Zell-Linie 7 als Bezugsstufe des Ko-Faktors CELL gewählt.

ERROR ist normalverteilter Fehlerterm.

...CO-FACTORS... : Dieser Term stellt die Linear-Kombination verschiedener Ko-Faktoren dar, abhängig von der wissenschaftlichen Fragestellung und den ausgewerteten Datensätzen. Es wurden acht verschiedene Auswertungen durchgeführt. Jeder Auswertung entspricht ein statistisches Modell mit der oben genannten Grundstruktur und einer zusätzlichen Ko-Faktor-Kombination (Tabelle 19).

3.3.2. Fragestellungen der statistischen Datenanalyse

Die Auswertung des Datensatzes erfolgte nach unterschiedlichen Fragestellungen (Tabelle 19). Zunächst erfolgte eine globale Analyse mit dem gesamten Datenmaterial ($n = 60$). Die übrigen Modelle orientieren sich an der Verwendung der Substanzen und dienen der quantitativen Analyse. Indem der durchschnittliche Effekt einer jeden Substanz als Parameter-Schätzer herausgerechnet wird, lässt sich eine Aussage darüber treffen, wie sich die verschiedenen Substanzen auf Differenzierung und Proliferation auswirken.

Modell 1 bildet den Versuchsaufbau insgesamt ab und ist daher besonders geeignet, die Korrelation zwischen Differenzierung und Proliferation sowie Unterschiede zwischen den Zell-Linien zu analysieren. Die Effekte der einzelnen Versuchsreihen und Experimente werden analysiert. Ausserdem lassen sich die Parameter-Schätzer von zwei beliebigen Experimenten direkt miteinander vergleichen; wegen der Vielzahl möglicher paarweiser Vergleiche soll dies aber mit der gebotenen Zurückhaltung geschehen.

Modell 2 analysiert die Effekte verschiedener Konzentrationen an FCS und verschiedener Kulturmedien unter Ausnutzung sämtlicher Daten.

Modell 3 analysiert den isolierten Effekt von FGF-2 in Gegenwart von Kulturmedium MEM und 20% FCS.

Modell 4 partitioniert die Varianz zwischen den Experimenten von Versuchsreihe 1. Da jedem Experiment im Wesentlichen nur eine bestimmte Substanz entspricht, die nur in diesem bestimmten Experiment verwendet wurde, können die Effekte der Experimente direkt als additiver Effekt der jeweiligen Substanz zusätzlich zu FGF-2 gedeutet werden.

Modell 5 analysiert im Wesentlichen die mittleren Effekte von FGF-8b, SHH und Heparin (Hep), wobei der Effekt von FGF-2 im Sinne eines Vergleichsmassstabes (interner Standard) verstanden werden kann.

Modell 6 analysiert die zusätzlichen Effekte der verschiedenen Beschichtungen in Gegenwart von FGF-2, FCS 20% und Kulturmedium MEM.

Modell 7 analysiert die zusätzlichen Effekte von B27 und N2 in Gegenwart von FGF-2 und bei Verwendung verschiedener Konzentrationsstufen von FCS und zwei verschiedener Kulturmedien. Modell 2 ist für die Analyse von FCS und der Kulturmedien besser geeignet, weil mit Modell 2 sämtliche Datensätze ausgewertet werden, während Modell 7 nur Versuchsreihe 4 analysiert. Für eine korrekte Modellierung müssen FCS und MEDIUM - unabhängig von der Interpretation - in Modell 7 enthalten sein.

Modell 8 analysiert die mittleren Effekte der verwendeten Wachstumsfaktoren und der in Versuchsreihe 5 verwendeten Beschichtung in Gegenwart von 1% FCS.

Tabelle 19: Grundstruktur der angewandten statistischen Modelle. * Alle Experimente mit Medium MEM und 20% FCS, bei denen ansonsten nur noch FGF-2 oder gar keine weiteren Bestandteile enthalten waren. ** Alle Experimente mit FGF-2, d. h. ohne das Kontroll-Experiment. *** Alle Experimente mit 1% FCS, d. h. ohne das Kontroll-Experiment.

Modell Nr.	...CO-FACTORS...	Ausgewertete Daten (Studie: Experimente)	Bemerkung
1	IDEXPER(STUDY) + STUDY	1-5: alle	
2	FCS + MEDIUM + STUDY	1-5: alle	
3	FGF-2 + STUDY	1-3: 1, 2. 4: 9, 10. 5: 1	*
4	IDEXPER	1: 2-9	**
5	FGF-2 + FGF-8b + HEP + SHH + FCS	2: alle	
6	PLL + PORN + LAM + FN + DRY	3: 2-13	**
7	B27 + N2 + FCS + MEDIUM	4: 2-13	**
8	FGF-2 + FGF-8b/SHH + NT-3 + BDNF + COAT	5: 2-15	***

Die in den statistischen Modellen verwendeten Ko-Faktor-Kombinationen werden im Folgenden erläutert:

IDEXPER ist das einzelne Experiment. Die Experimente sind über die Grenzen der Versuchsreihe hinweg durchnummeriert und dadurch eindeutig identifiziert.

STUDY ist die Versuchsreihe. Dieser Term adjustiert dafür, dass bestimmte Experimente zu einer gemeinsamen Versuchsreihe gehören. Der Term STUDY ist für die statistische Analyse unseres Versuchsaufbaus zwecks adäquater Varianz-Zerlegung notwendig.

IDEXPER(STUDY) ist die hierarchische Verschachtelung von IDEXPER innerhalb von STUDY. Dieser Term adjustiert dafür, dass jedes bestimmte Experiment nur innerhalb von genau einer Versuchsreihe vorkommt.

FCS ist die Konzentrationsstufe von FCS und ist als Ko-Faktor je nach ausgewerteten Datensätzen mit bis zu vier Stufen (0%, 1%, 5% und 20%) modelliert. Die jeweils niedrigste Konzentration wurde als Bezugsstufe gewählt: in Modell 1 entspricht diese der Konzentration 0%, in Modell 5 1%.

MEDIUM ist das Kulturmedium. Je nach ausgewerteten Datensätzen hat dieser Faktor bis zu vier Stufen: MEM, F12, Neurob_B27 und DMEM. Die Faktorstufe MEM wurde stets als Bezugsstufe gewählt.

DRY ist der Trocknungsgrad der Beschichtung im Rahmen von Versuchsreihe 3 mit den drei Stufen „Beschichtung ohne Trocknung“ (not_dry), „Beschichtung mit Trocknung“ (dry), „keine Beschichtung“ (no_coat).

FGF-8b/SHH ist die gemeinsame Verwendung der beiden Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH in Versuchsreihe 5. In dieser Versuchsreihe wurden die beiden Substanzen entweder nur zusammen oder gar nicht eingesetzt. Bei der isolierten Auswertung von Versuchsreihe 5 können diese Substanzen nur als ein einziger Ko-Faktor modelliert werden.

FGF-2, FGF-8b, SHH, NT-3, BDNF, HEP, SHH, B27, N2, PLL, PORN, LAM, FN, COAT: Diese zweistufigen Ko-Faktoren modellieren die Anwesenheit oder Abwesenheit der entsprechenden Substanz.

Die Auswertung erfolgte mit dem verallgemeinerten linearen Modell (General Linear Model, GLM) mit den Typ-III-Abweichungssquadraten, weil diese für Imbalancen in den Daten invariant sind. Verwendet wurde die Software SPSS 10.0. Bei der statistischen Auswertung wurden p-Werte, die kleiner als 0,05 sind, als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Lichtmikroskopische Auswertung

Die einzelnen Versuchskammern mit ihren jeweils definierten Kulturbedingungen wurden an jedem zweiten Kulturtag lichtmikroskopisch beurteilt. Beobachtet wurden Proliferation und morphologische Veränderung. Tabelle 20 stellt zusammenfassend die Befunde für die Mehrheit der Experimente der jeweiligen Versuchsreihe dar. In Versuchsreihe 1 zeigte sich insbesondere für das Standardmedium MEM und das Medium DMEM ein günstiger Einfluss auf die Proliferation der Zellen. In der zweiten Versuchsreihe resultierte aus der visuellen Beurteilung für die beiden Wachstumsfaktoren FGF-2 und FGF-8b bei hohem Serumanteil ein positiver Einfluss hinsichtlich Proliferation. Unter Verwendung der neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH einzeln oder in Kombination kam es in den Kulturbedingungen mit minimalem Serumanteil zu einer starken Ausprägung einer neuronalen Zellmorphologie. Die Zelldichte nahm dabei ab. Ein differenzierteres Bild ergab die Beurteilung von Proliferation und neuronaler Morphologie unter Verwendung unterschiedlicher Beschichtungsmaterialien: Beschichtungen mit FN zeigten einzeln und in Kombination mit LAM einen stark proliferativen Effekt auf die Zellen, während sich die kombinierte Beschichtung mit PLL und PORN inhibierend auf die Proliferation der Zellen auswirkte. Die Beschichtungen mit PLL einzeln oder in Kombination mit PORN sowie die Beschichtung mit PORN und LAM wirkte sich hingegen günstig auf die Ausprägung einer neuronalen Zellmorphologie aus. Zellkulturen, die mit PLL oder mit einer Kombination von PORN und LAM behandelt wurden, wiesen dabei gegenüber Kulturen mit einer kombinierten Beschichtung aus PLL und PORN im Schnitt eine höhere Zelldichte auf. Für die Verwendung von FCS zeigte sich eine starke Inhibition der Zellproliferation in serumfreien Kulturbedingungen. Die Kulturbedingung mit minimalem Serumanteil und dem Standardmedium MEM zeigte einen günstigen Einfluss hinsichtlich neuronaler Morphologie. In Versuchsreihe 5 wurden verschiedene Kulturfaktoren kombiniert. Sämtliche Kulturbedingungen der Versuchsreihe zeigten einen starken Einfluss auf die Ausprägung einer neuronalen Morphologie. Der inhibierende Effekt auf die Proliferation der Zellen war in den Kulturbedingungen mit Beschichtung besonders ausgeprägt.

Studie	Medienvergleich (GF: FGF-2)								
1	MEM	F12_B27	F12_N2	MEM_nuk	Neurob_B27	MEM_glc	DMEM	MEM_hep	
	++	+	+	++	+	++	++	++	
2	Vergleich neuer Wachstumsfaktoren (Medium: MEM)								
	FGF-2	FGF-8b	FGF-8b_hep	SHH	FGF-8b_SHH	FGF-8b_SHH_hep	FGF-8b	SHH	FGF-8b_SHH
	+ FCS 20%						+ FCS 1%		
	++	++	+	+	+	+	-/▲	-/▲	-/▲
3	Vergleich von Beschichtung (Medium: MEM; GF: FGF-2)								
	No_coat	PLL_dry	PLL_PORN_dry	PLL_PORN_not_dry		PORN_LAM_dry	PORN_LAM_not_dry		
	+	+/ Δ	-/ Δ	-		+/ Δ	+		
	FN_dry	FN_LAM_dry	FN_LAM_not_dry	PORN_dry		PORN_not_dry	LAM_dry		
	++	++	++	+		+	+		
4	Vergleich von Serumanteil (Medien: F12 & MEM; GF: FGF-2)								
	F12_B27	F12_N2	F12_B27	F12_N2	F12_B27	F12_N2	F12_B27		
	+ FCS 20%		+ FCS 5%		+ FCS 1%		+ FCS 0%		
	+	+	+	+	+	+	--		
	MEM								
	+ FCS 20%		+ FCS 5%		+ FCS 1%		+ FCS 0%		
	+		+		-/ Δ		--		
5	„Best-Off“-Protokoll								
	FGF-2	FGF-8b_SHH	FGF-2_FGF-8b_SHH	NT-3	FGF-2_NT-3	BDNF	FGF-2_BDNF		
	No coat								
	-/▲	-/▲	-/▲	-/▲	-/▲	-/▲	-/▲		
	FGF-2	FGF-8b_SHH	FGF-2_FGF-8b_SHH	NT-3	FGF-2_NT-3	BDNF	FGF-2_BDNF		
	PLL_PORN_dry								
	--/▲	--/▲	--/▲	--/▲	--/▲	--/▲	--/▲	--/▲	

Tabelle 20: Schematische Repräsentation der lichtmikroskopischen Befunde für die Mehrheit der Experimente der jeweiligen Versuchsreihe am Tag 6 der Zellkultur. Proliferation, gegenüber initialer Zellzahl: + (mässige Proliferation), ++ (starke Proliferation), - (Proliferation inhibierend), -- (Proliferation stark inhibierend). Neuronale Differenzierung: Δ (neuronale Morphologie mässig ausgeprägt), ▲ (neuronale Morphologie stark ausgeprägt). GF = Wachstumsfaktor.

4.2. Globale Datenanalyse

In einem ersten Schritt wurde das gesamte Datenmaterial in einer globalen Analyse ausgewertet. In unseren Versuchsreihen (n = 60) fanden insgesamt 13 Zell-Linien nicht näher bekannter Spender Verwendung. Die Parameter-Schätzer (B) sind als Differenz zur Bezugsstufe berechnet. Sie geben an, um wie viele Einheiten die abhängigen Variablen (B3Plus, B3Null, B3Minus, PI) im Durchschnitt gegenüber der Bezugsstufe verändert sind. Die Ergebnisse dieser vorgeschalteten Tests enthalten bereits die wesentlichen Ergebnisse. Die Auswertung des gesamten Datensatzes ergab, dass sich die **einzelnen Zell-Linien der verschiedenen Spender signifikant in ihrer Antwort auf die Kulturbedingungen unterscheiden**. So zeigte Zell-Linie 19 hinsichtlich der Variable B3Plus im Durchschnitt 18% weniger Response auf die Kulturbedingungen. Im Gegensatz dazu zeigte Zell-Linie 15 ein deutlich besseres Ansprechen auf die experimentellen Stimuli (7% im Durchschnitt) (Tabelle 21).

Tabelle 21: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (globale Analyse) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im globalen Analysemodell (Bezugsstufe war Zell-Linie 13).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	Cell 15	6.92	0.012	1.57	12.28
	Cell 19	-18.01	0.000	-26.30	-9.72

Deutlich mehr Proliferation im Vergleich zur Bezugsstufe zeigten die Zellen der Zell-Linien 14 (7% im Durchschnitt), 16 (4% im Durchschnitt) und 18 (12% im Durchschnitt). Weniger proliferationsfreudig erwiesen sich hingegen die Zellen der Zell-Linie 8 (- 4% im Durchschnitt) und 11 (- 3% im Durchschnitt), ohne dass die Unterschiede Signifikanz erreichten (Tabelle 22).

Tabelle 22: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (globale Analyse) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im globalen Analysemodell (Bezugsstufe war Zell-Linie 13).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	Cell 8	-4.35	0.093	-9.44	-0.74
	Cell 11	-2.65	0.306	-7.74	2.44
	Cell 14	6.93	0.000	4.49	9.38
	Cell 16	3.75	0.016	0.71	6.79
	Cell 18	11.98	0.000	7.54	16.42

Für die verwendeten Zellkulturfaktoren ergab die Auswertung des gesamten Datenmaterials folgende Ergebnisse (Tabelle 23 & 24): Die unterschiedlichen Kulturmedien, der hohe Glukoseanteil, die Zugabe von Heparin oder Nukleosiden sowie der Zellkulturzusätze B27 und N2 brachten keine signifikanten Unterschiede, weder hinsichtlich neuronaler Differenzierung, noch hinsichtlich Proliferation der Zellen.

Die untersuchten **Wachstumsfaktoren übten allesamt einen signifikanten Effekt hinsichtlich neuronaler Differenzierung aus**. Dabei zeigte sich für die Faktoren NT-3, BDNF und FGF-8b mit schwachen Signifikanzen ein inhibierender Effekt hinsichtlich Proliferation. Die Anwesenheit von SHH und FGF-2 hatte statistisch keinen auffälligen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Höhere Serumkonzentrationen wirkten sich tendenziell inhibierend auf die neuronale Differenzierung aus, während sich für die *minimal-serum-*

condition tendenziell günstigste Effekte ergaben. Gegenüber den serumfreien Kulturbedingungen, die als Bezugsstufe gewählt wurden, waren die Unterschiede aber nicht signifikant. **Mit der Reduktion des Serumanteils war eine kontinuierliche Abnahme des Zellwachstums zu beobachten.** Für die Serumstufen von 20% und 5% ergaben sich signifikante Unterschiede. **Unterschiedliche Effekte** ergaben sich **für die verwendeten Beschichtungsmaterialien:** Durch die Vorbehandlung der OT mit dem synthetischen PORN konnte der Anteil an vordifferenzierten Zellen in der Kulturbedingung signifikant erhöht werden, während das Wachstum der Zellen nicht auffällig beeinflusst wurde. Für die Beschichtung mit PLL ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich neuronaler Differenzierung oder Proliferation der Zellen. Beschichtungen mit LAM und FN übten dagegen einen inhibierenden Einfluss auf die neuronale Differenzierung aus. Ausgeprägt positive Effekte zeigten sich für die beiden Matrixproteine hinsichtlich Proliferation der Zellen.

Tabelle 23: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (globale Analyse) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im globalen Analysemodell (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	DMEM	-4.87	0.298	-14.06	4.32
	Neurob_B27	5.31	0.497	-10.05	20.67
	F12	4.51	0.476	-7.94	16.96
	Glc	-3.87	0.408	-13.06	5.32
	Nuk	-5.95	0.203	-15.14	3.24
	Hep	-2.77	0.365	-8.78	3.24
	B27	-4.96	0.434	-17.42	7.50
	N2	-5.66	0.377	-18.25	6.93
	FGF-2	13.23	0.000	10.06	16.41
	FGF-8b	11.38	0.000	6.57	16.20
	SHH	7.73	0.001	3.10	12.36
	NT-3	13.88	0.000	7.89	19.88
	BDNF	10.93	0.000	4.85	17.02
	FCS 20%	-2.99	0.456	-10.89	4.90
	FCS 5%	-3.98	0.383	-12.96	4.00
	FCS 1%	7.12	0.088	-1.08	15.32
	PLL	3.69	0.345	-3.98	11.35
	PORN	9.62	0.018	1.68	17.56
	LAM	-14.05	0.000	-21.22	-6.89
	FN	-8.31	0.091	-17.96	1.35

Tabelle 24: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (globale Analyse) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im globalen Analysemodell (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	DMEM	4.32	0.184	-2.075	10.714
	Neurob_B27	-3.50	0.520	-14.19	7.20
	F12	-4.72	0.284	-13.39	3.94
	Glc	2.04	0.530	-4.36	8.43
	Nuk	1.72	0.597	-4.68	8.11
	Hep	2.49	0.242	-1.70	6.67
	B27	0.42	0.924	-8.26	9.10
	N2	-2.30	0.607	-11.10	6.47
	FGF-2	-0.69	0.538	-2.904	1.518
	FGF-8b	-3.97	0.021	-7.32	-0.61
	SHH	-2.28	0.165	-5.50	0.95
	NT-3	-4.46	0.036	-8.63	-0.28
	BDNF	-4.74	0.029	-8.97	-0.50
	FCS 20%	11.57	0.000	6.08	17.07
	FCS 5%	7.49	0.019	1.24	13.74
	FCS 1%	1.06	0.715	-4.65	6.77
	PLL	2.23	0.411	-3.10	7.57
	PORN	0.046	0.987	-5.48	5.57
	LAM	16.77	0.000	11.78	21.76
	FN	14.27	0.000	7.55	20.99

4.3. Korrelation von Differenzierung und Proliferation

Das statistische Modell 1 bildet den Versuchsaufbau insgesamt ab. Die Parameter-Schätzer von zwei beliebigen Experimenten lassen sich direkt miteinander vergleichen. Darauf werden wir bei der Besprechung der einzelnen Versuchsreihen zurückgreifen. Wegen der Vielzahl möglicher paarweiser Vergleiche soll das aber mit der gebotenen Zurückhaltung geschehen. Da Modell 1 den gesamten Versuchsaufbau abbildet, ist es besonders geeignet, die Korrelation zwischen Differenzierung und Proliferation sowie Unterschiede zwischen den Zell-Linien zu analysieren. Die Signifikanzen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das Kontroll-Experiment der Versuchsreihe 5, weil hier die Versuche insgesamt sechsmal durchgeführt wurden.

Im gesamten Datenmaterial war der PI mit B3Plus negativ assoziiert (Korrelationskoeffizient -0.28), aber mit B3Minus positiv assoziiert (Korrelationskoeffizient +0.24). Die Assoziation zwischen PI und B3Null war demgegenüber sehr viel kleiner (Korrelationskoeffizient -0.02), was darauf hinweist, dass B3Null und PI voneinander unabhängig waren (Tabelle 25). Dies bedeutet, dass B3Null von den Kulturmedien deutlich weniger stark beeinflusst wurde als B3Plus und B3Minus. Die Korrelationskoeffizienten von B3Plus, B3Null und B3Minus untereinander müssen zurückhaltend interpretiert werden. Die drei Variablen sind bereits messtechnisch extrem korreliert, denn die Summe der drei Variablen ist in jedem einzelnen Experiment stets 100%.

Tabelle 25: *Residual* SSCP Matrix über das gesamte Datenmaterial (= 60 Experimente) basierend auf den Typ-III-Abweichungsquadraten. Da es sich um Korrelationskoeffizienten zwischen abhängigen Variablen handelt, gibt es keine zugehörigen p-Werte.

Korrelation	B3Plus	B3Null	B3Minus	PI
B3Plus	1.00	-0.28	-0.53	-0.28
B3Null	-0.28	1.00	-0.66	-0.02
B3Minus	-0.53	-0.66	1.00	0.24
PI	-0.28	-0.02	0.24	1.00

Die Variable B3Null wird am wenigsten deutlich bis überhaupt nicht von den experimentellen Bedingungen beeinflusst. Der Eindruck, dass diese Zellpopulation nicht reagibel auf die experimentellen Stimuli ist, wird von der Statistik untermauert. Die Ergebnisse für die Variable B3Minus sind denen für B3Plus ähnlich, nur mit umgekehrtem Vorzeichen. Die Beschreibung der Ergebnisse wird sich daher im Wesentlichen auf die Beschreibung der abhängigen Variablen B3Plus als Parameter für die neuronale Differenzierung und des PI als Grösse für die Proliferation beschränken. Auf die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen werden die folgenden Abschnitte näher eingehen. Grundlage für die Auswertung ist das oben beschriebene Analysemodell 1. Die weiteren verwendeten Modelle bilden nicht den Versuchsaufbau, sondern die Verwendung der Substanzen ab und dienen der quantitativen Analyse. Indem der durchschnittliche Effekt einer jeden Substanz als Parameter-Schätzer herausgerechnet wird, lässt sich direkt quantifizieren, wie sich die verschiedenen Substanzen auf Differenzierung und Proliferation auswirken.

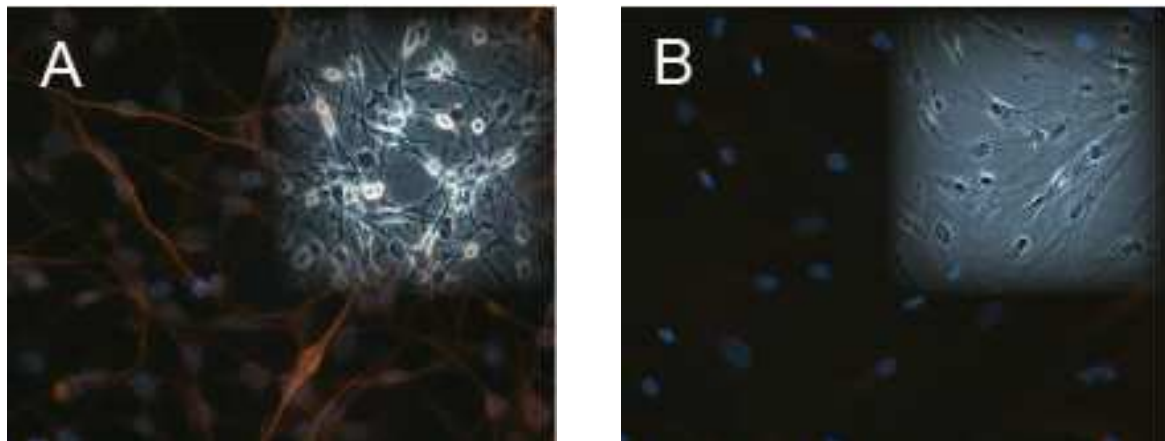


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin (oberer Bildrand Phasenkontrast-Aufnahme): β -III-Tubulin-positive Zellen (TRITC-gelabelter Antikörper, rot) der neuronalen Stammzell-Linie C17.2 (A) haben eine neuronale Morphologie und zeigen in der Phasenkontrast-Aufnahme typischerweise eine glänzende Oberfläche. Undifferenzierte mesenchymale Stromazellen (B) zeigen eine fibroblasten-ähnliche Morphologie und exprimieren kein β -III-Tubulin. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.4. Einflussfaktoren neuronaler Differenzierung

4.4.1. Einfluss des Mediums

In der ersten Versuchsreihe wurden verschiedene Medien und Zusätze getestet.

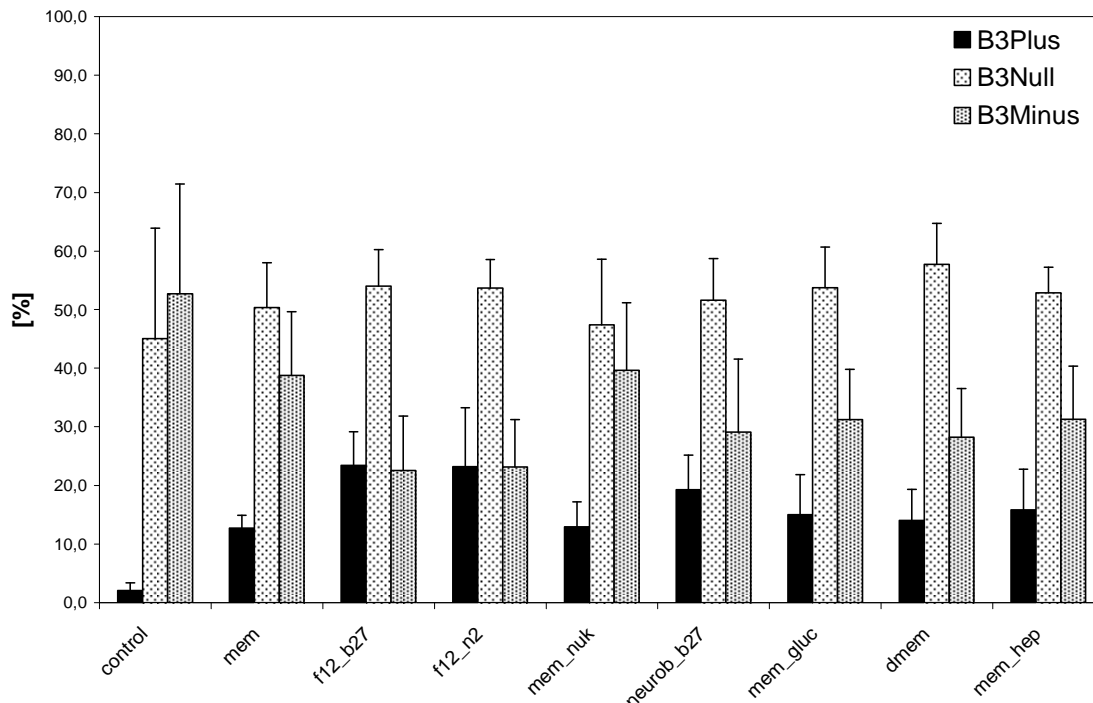


Abbildung 3: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in unterschiedlichen Medien (FGF-2, FCS 20%). *Control:* kein FGF-2, MEM, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

In der Versuchsreihe wurden nicht alle Faktorvarianten konsequent getestet. Eine Aufspaltung der einzelnen Einflussfaktoren ist daher aufgrund des inkompletten Blockdesigns nicht möglich. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung müssen daher als Gesamteffekt der Kulturbedingung des jeweiligen Experiments verstanden werden.

Im statistischen Modell 1 zeigten die Effekt-Schätzer bei allen Kulturbedingungen deutlich positive Werte. Es gibt demnach einen **Trend, dass alle Kulturbedingungen der Versuchsreihe den Anteil an B3-positiven Zellen erhöhen**. Die Experimente, die das **Medium F12 oder Neurobasal™** mit den Zusätzen B27 oder N2 enthielten, zeigten dabei den **grössten Effekt** hinsichtlich neuronaler Differenzierung. Im Durchschnitt wiesen 13-17% der untersuchten Zellen eine B3-positive Reaktion auf (Tabelle 26). Die Unterschiede waren gegenüber der Kontrolle signifikant. Der direkte Vergleich der Parameter-Schätzer für die Versuchsbedingungen mit F12-Medium zeigte keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Supplement N2 und dem komplexeren B27-Supplement. Für die anderen getesteten Medien MEM und dessen unterschiedliche Formulierungen sowie DMEM, mit ebenfalls FGF-2 als Standardwachstumsfaktor, liessen sich keine Signifikanzen gegenüber dem Kontroll-Experiment nachweisen.

Tabelle 26: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	MEM	6.02	0.30	-5.32	17.36
	MEM_glc	8.34	0.15	-3.00	19.68
	MEM_nuk	6.26	0.28	-5.08	17.60
	MEM_hep	9.01	0.15	-3.14	21.14
	DMEM	7.34	0.20	-4.00	18.68
	F12_B27	16.78	0.00	5.44	28.12
	F12_N2	16.50	0.01	5.16	27.84
	Neurob_B27	12.56	0.03	1.22	23.90

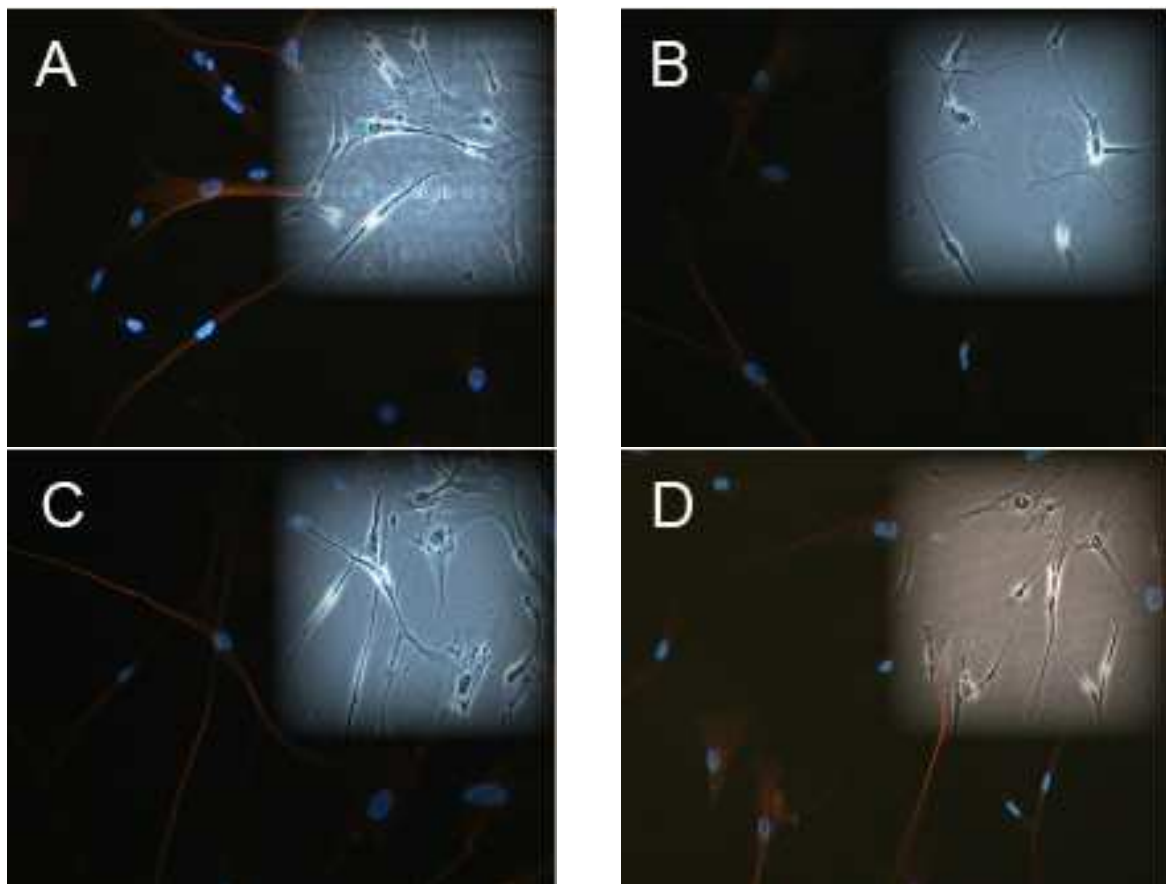


Abbildung 4: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Anwesenheit unterschiedlicher Kulturmedien (immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin, TRITC-gelabelter Antikörper, rot; oberer Bildrand: Phasekontrast-Aufnahme): (A) MEM, FGF-2, FCS 20% (B) F12_B27, FGF-2, FCS 20% (C) F12_N2, FGF-2, FCS 20% (D) Neurob_B27, FGF-2, FCS 20%. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.4.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden die Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH neu eingeführt und gegenüber dem Standardwachstumsfaktor FGF-2 bei hohem Serumanteil (FCS 20%) und *minimal-serum-condition* (FCS 1%) bewertet. Heparinfaktor war jeweils in zwei Kulturbedingungen beigelegt und wurde für diese Versuchsreihe statistisch ausgewertet.

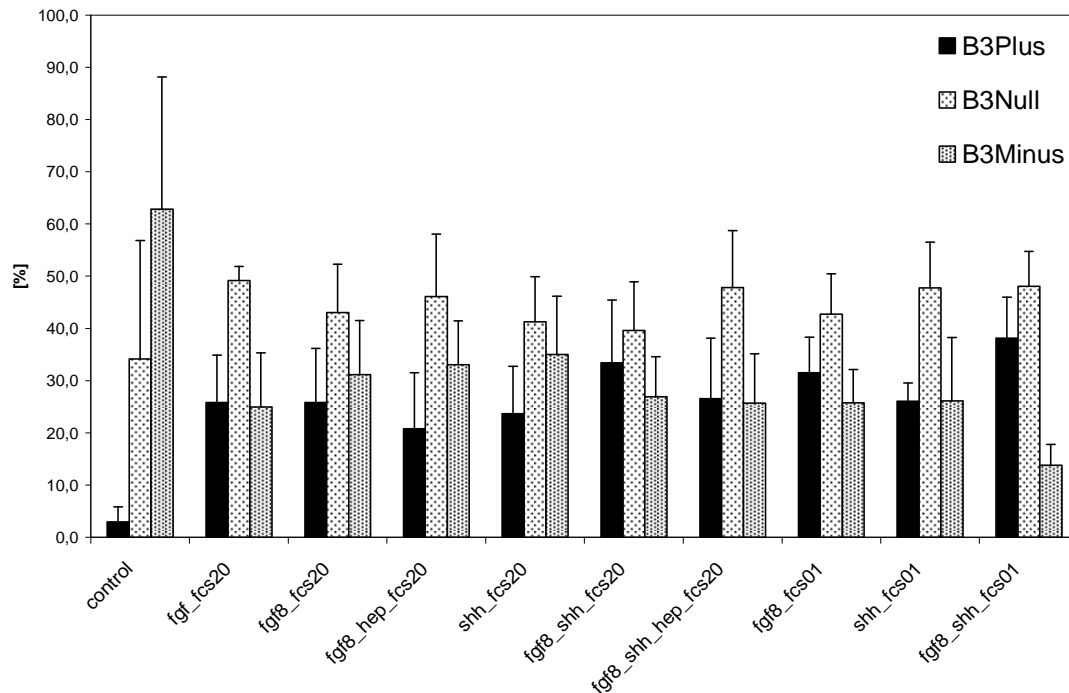


Abbildung 5: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) mit neu eingeführten Wachstumsfaktoren bei variierendem Serumanteil. Standardmedium: MEM. Control: kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Im Vergleich der Einzelexperimente untereinander (Modell 1) waren **alle differenzierenden Kulturbedingungen** der zweiten Versuchsreihe bis auf die Kombination von FGF-8b und Heparin bei hoher Serumkonzentration **auffällig gegenüber der Kontrollbedingung** (Tabelle 27). **Besonders effektiv** war in dieser Versuchsreihe die Kombination der Wachstumsfaktoren **FGF-8b und SHH**. Noch deutlicher zeigte sich der Effekt bei *minimal-serum-condition*. Mit dieser Kulturbedingung konnte ein additiver Effekt von 28% gegenüber der Kontrollbedingung erreicht werden.

Tabelle 27: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	FGF-2	13.91	0.009	3.49	24.32
	FGF-8b	13.91	0.009	3.49	24.32
	FGF-8b/Hep	8.89	0.094	-1.53	19.30
	SHH	11.75	0.027	1.33	22.16
	FGF-8b/SHH	20.80	0.000	9.63	31.96
	FGF-8b/SHH/Hep	14.59	0.006	4.17	25.00
	FGF-8b/FCS 1%	19.59	0.000	9.17	30.00
	SHH/FCS 1%	15.56	0.006	4.54	26.57
	FGF-8b/SHH/FCS 1%	27.56	0.000	16.54	38.57

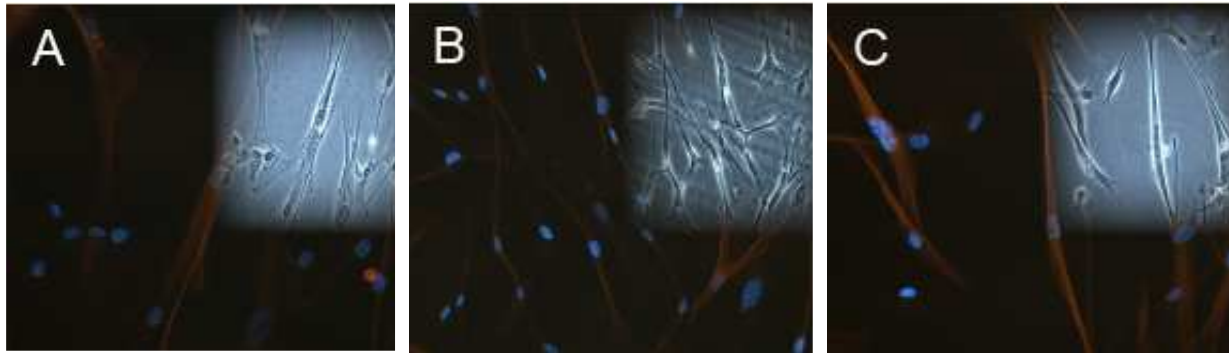


Abbildung 6: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Anwesenheit unterschiedlicher Wachstumsfaktoren (immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin, TRITC-gelabelter Antikörper, rot; oberer Bildrand: Phasenkontrast-Aufnahme): (A) MEM, SHH, FCS 20% (B) MEM, FGF-8b, FCS 20% (C) MEM, SHH/FGF-8b, FCS 20%. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.4.3. Einfluss der Beschichtung

In der dritten Versuchsreihe interessierte, ob die Beschichtung der OT mit unterschiedlichen Materialien und unterschiedlichem Trocknungsgrad die Differenzierung noch weiter begünstigt.

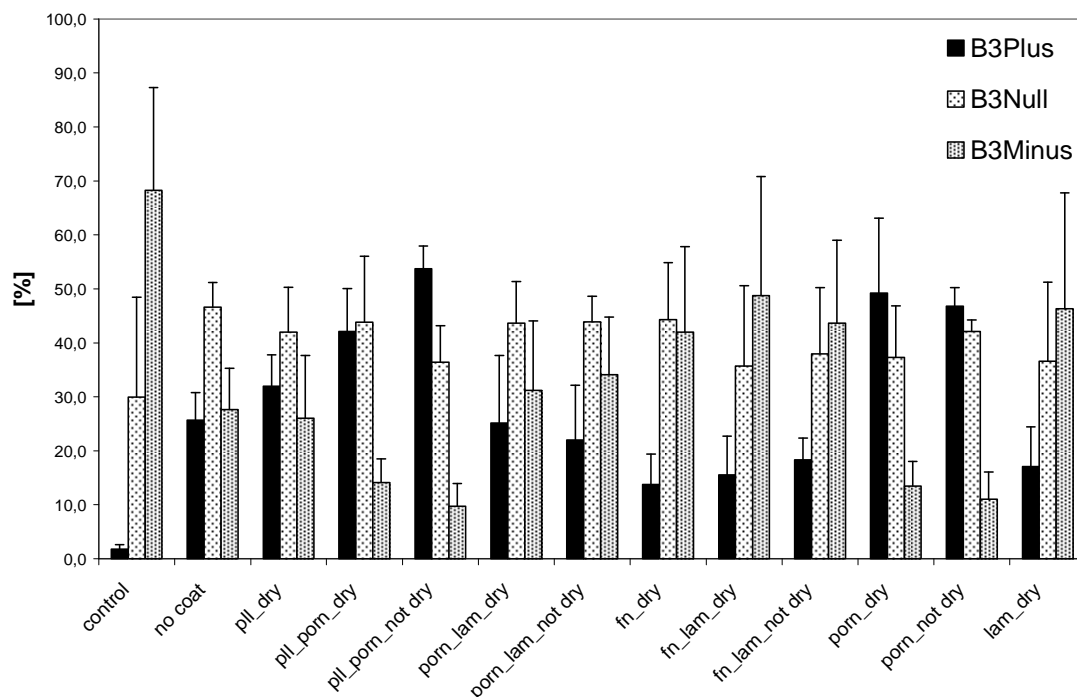


Abbildung 7: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in Anwesenheit unterschiedlicher Beschichtungsmaterialien und bei unterschiedlichen Trocknungsgraden (keine Trocknung bzw. >2 bis >6h Trocknung bei RT). Standardkulturbedingung: MEM, FCS 20%, FGF-2. *Control*: ohne *coat* und ohne FGF-2. *No-coat-control*: ohne *coat* aber mit FGF-2. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Im Vergleich der Einzelexperimente (Modell 1) ergaben sich für die verwendeten Beschichtungsmaterialien eindeutige Unterschiede: **wenig Einfluss auf die neuronale Differenzierung zeigten die Proteinlösungen FN und LAM, während die synthetischen Adhäsionsfaktoren PLL und PORN einen deutlich positiven Einfluss ausübten.** In der statistischen Analyse zeigten die Protein-basierten Beschichtungen keine statistische Signifikanz gegenüber dem Kontroll-Experiment. Die PLL- und PORN-basierten *coatings* waren allesamt signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle (Tabelle 28). Die

Beschichtung mit PORN hatte dabei den grössten Effekt: die Kulturbedingung ohne Trocknung erzielte im Durchschnitt einen Anteil von 37% vordifferenzierter Zellen, die Experimente mit Trocknung von 39%. Für die kombinierten Beschichtungen ergab sich folgendes Bild: gegenüber der alleinigen Beschichtung mit FN ergab die Kombination mit LAM einen marginal höheren Anteil an B3-positiven Zellen. Vorteile zeigten sich ebenso für die zusätzliche Verwendung von PORN im Vergleich zur Einzelbeschichtung mit LAM. Ein **hoher Anteil differenzierter Zellen** konnte **durch die kombinierte Beschichtung von PLL und PORN** erreicht werden. Gegenüber den Kulturbedingungen mit PLL ergab sich ein deutlicher Unterschied. Gegenüber der alleinigen Verwendung von PORN wurden keine zusätzlichen Effekte der kombinierten Beschichtung deutlich.

Die Ergebnisse der Beschichtungsversuche in Versuchsreihe 3 lassen den Schluss zu, dass die herausragenden Ergebnisse hinsichtlich neuronaler Differenzierung in den kombinierten Beschichtungsversuchen in erster Linie auf die Verwendung von PORN zurückzuführen sind. Der numerisch höchste Anteil vordifferenzierter Zellen wurde durch die Verwendung von PLL und PORN ohne Trocknung (*not dry*) erzielt.

Tabelle 28: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	No coat	15.82	0.004	5.25	26.38
	PLL_dry	21.83	0.000	10.46	33.21
	PLL_PORN_dry	32.58	0.000	20.13	45.02
	PLL_PORN_not_dry	43.70	0.000	32.58	54.81
	PORN_LAM_dry	15.28	0.005	4.71	25.84
	PORN_LAM_not_dry	12.10	0.025	1.53	22.66
	FN_dry	3.86	0.473	-6.71	14.42
	FN_LAM_dry	5.62	0.365	-6.59	17.82
	FN_LAM_not_dry	8.45	0.174	-3.75	20.66
	PORN_dry	39.23	0.000	26.64	51.82
	PORN_not_dry	36.71	0.000	25.33	48.09
	LAM_dry	7.31	0.204	-4.01	18.63

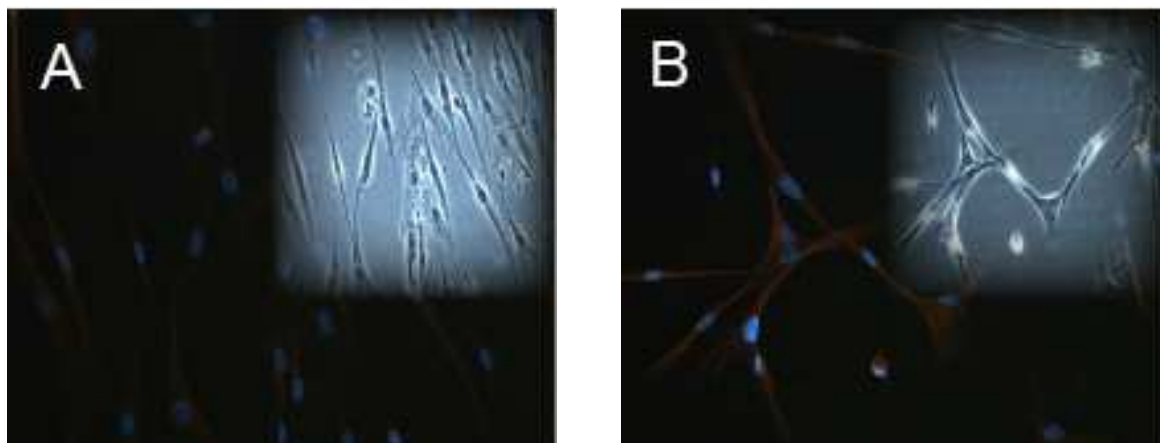


Abbildung 8: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Anwesenheit unterschiedlicher Beschichtungen (immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin, TRITC-gelabelter Antikörper, rot; oberer Bildrand: Phasenkontrast-Aufnahme): (A) MEM, FN_LAM_not_dry, FGF-2, FCS 20% (B) MEM, PLL_PORN_not_dry, FGF-2, FCS 20%. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.4.4. Einfluss des Serumanteils

Versuchsreihe 4 untersuchte den Einfluss des Serumanteils auf die Expressierung des neuronalen Markers β -III-Tubulin. Dabei wurde der Serumanteil in vier Stufen bis zu serumfreien Kulturen reduziert. Als Medium wurde MEM und F12 verwendet. Entsprechend wurden jeweils zwei Kontroll-Experimente mit MEM/FCS 20% und F12/FCS 5% durchgeführt.

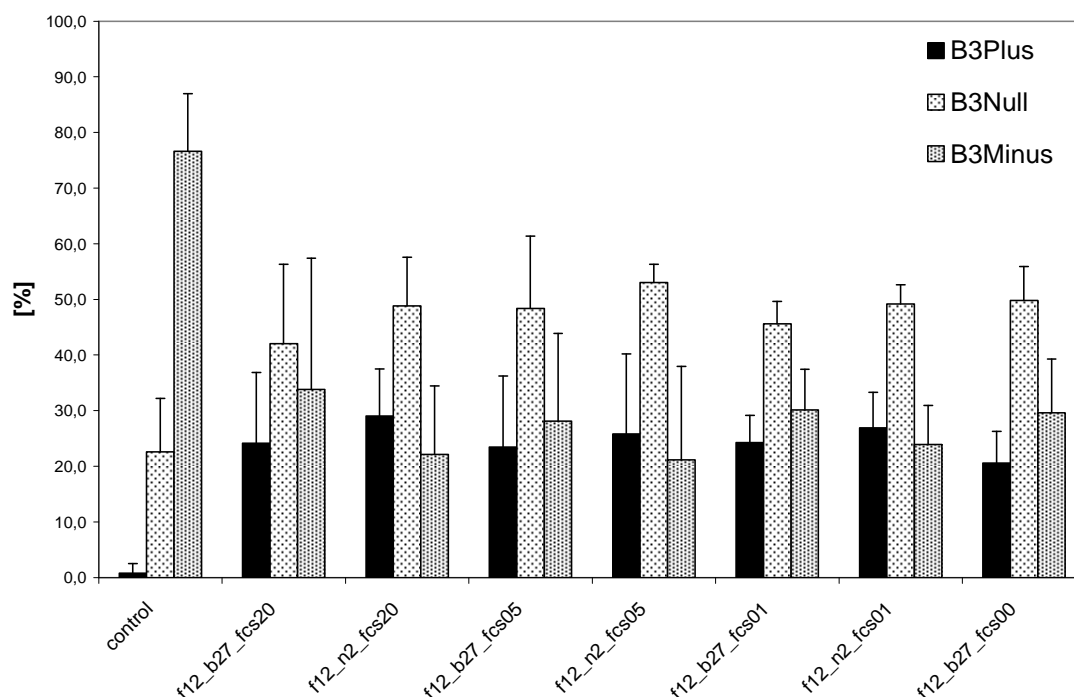


Abbildung 9: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in F12-Medium bei variierendem Serumanteil. Control: kein FGF-2, N2, FCS 5%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

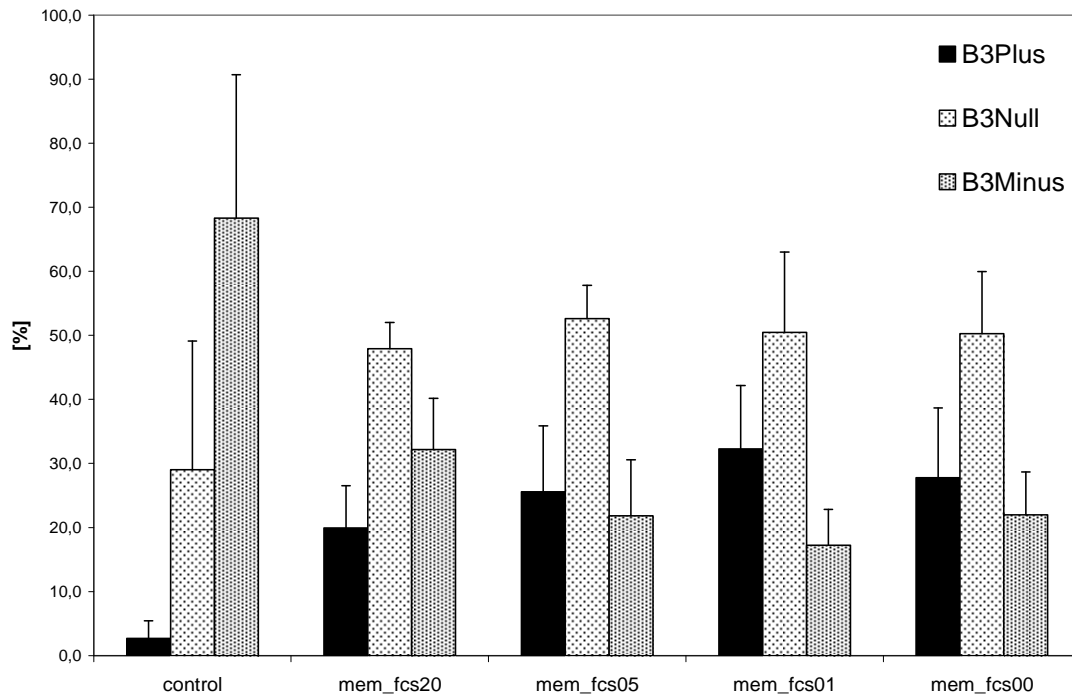


Abbildung 10: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in MEM-Medium bei variierendem Serumanteil. *Control*: kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

In den Kulturbedingungen, in denen das Medium F12 Verwendung fand, ergab die statistische Analyse keinen eindeutig günstigen Einfluss eines reduzierten Serumanteils auf die neuronale Differenzierung. Deutlichere Unterschiede waren für die Experimente mit MEM-Medium zu erkennen. Unter den Effekt-Schätzern der multivariaten Analyse zeigte das Experiment mit 1% Serumanteil in MEM-Medium den grössten zusätzlichen Einfluss auf den Anteil B3-positiver Zellen gegenüber der Kontrolle (Tabelle 29). Bis auf das Experiment mit FGF-2 in MEM und 20% Serumanteil erreichten alle Experimente statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle.

Tabelle 29: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	F12_B27/FCS 20%	12.23	0.030	1.19	23.27
	F12_N2/FCS 20%	17.87	0.002	6.67	29.06
	F12_B27/FCS 5%	12.74	0.017	2.31	23.18
	F12_N2/FCS 5%	15.77	0.010	3.80	27.74
	F12_B27/FCS 1%	15.20	0.007	4.16	26.24
	F12_N2/FCS 1%	16.18	0.003	5.75	26.62
	F12_B27/FCS 0%	11.55	0.040	0.51	22.59
	MEM/FCS 20%	9.18	0.084	-1.25	19.62
	MEM/FCS 5%	16.55	0.003	5.51	27.59
	MEM/FCS 1%	21.52	0.000	11.09	31.96
	MEM/FCS 0%	19.26	0.002	7.21	31.31

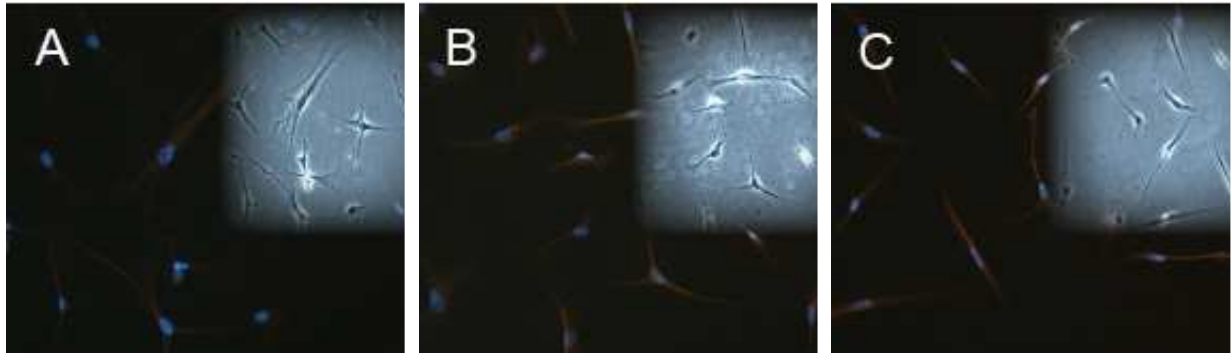


Abbildung 11: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Anwesenheit unterschiedlicher Wachstumsfaktoren bei minimalem Serumanteil (immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin, TRITC-gelabelter Antikörper, rot; oberer Bildrand: Phasenkontrast-Aufnahme): (A) MEM, FGF-2/BDNF, FCS 1% (B) MEM, FGF-2/NT-3, FCS 1% (C) MEM, FGF-2/FGF-8b/SHH, FCS 1%. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.4.5. Einfluss der Kombination der Faktoren im "Best-Off"-Protokoll

In einer letzten Versuchsreihe wurden im Sinne eines "Best-off" Faktoren miteinander kombiniert, die die neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen nach Erkenntnissen der vorangegangenen Versuchsreihen besonders begünstigen.

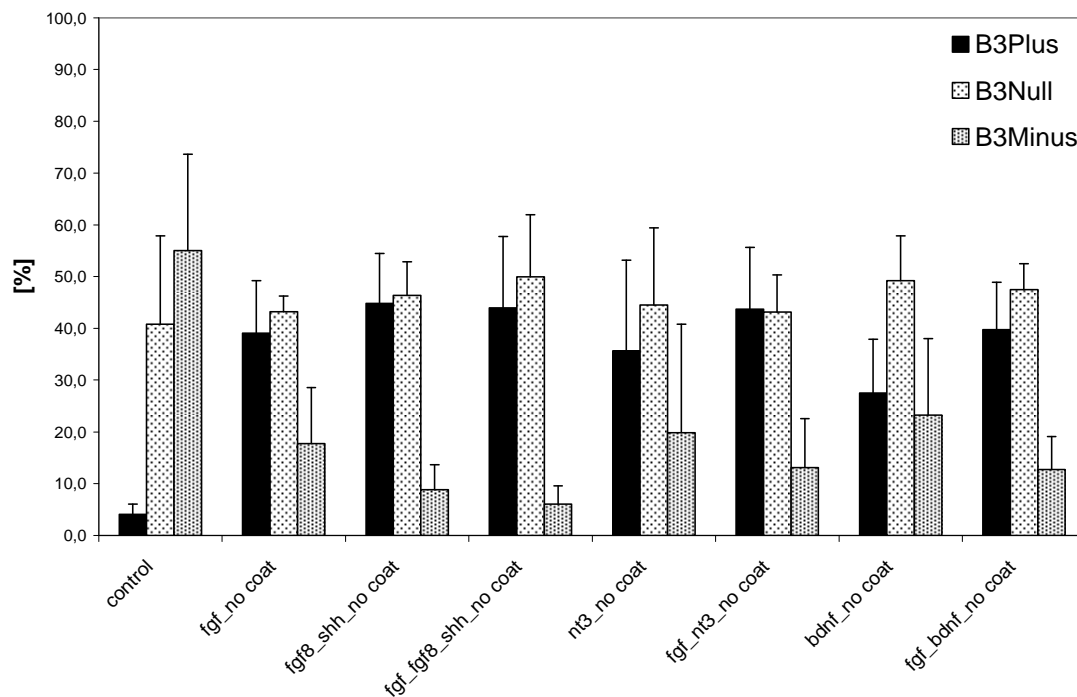


Abbildung 12: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 6) nach "Best off"-Protokoll (Standardmedium MEM, neu eingeführte Wachstumsfaktoren, FCS 1%). *Control*: kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

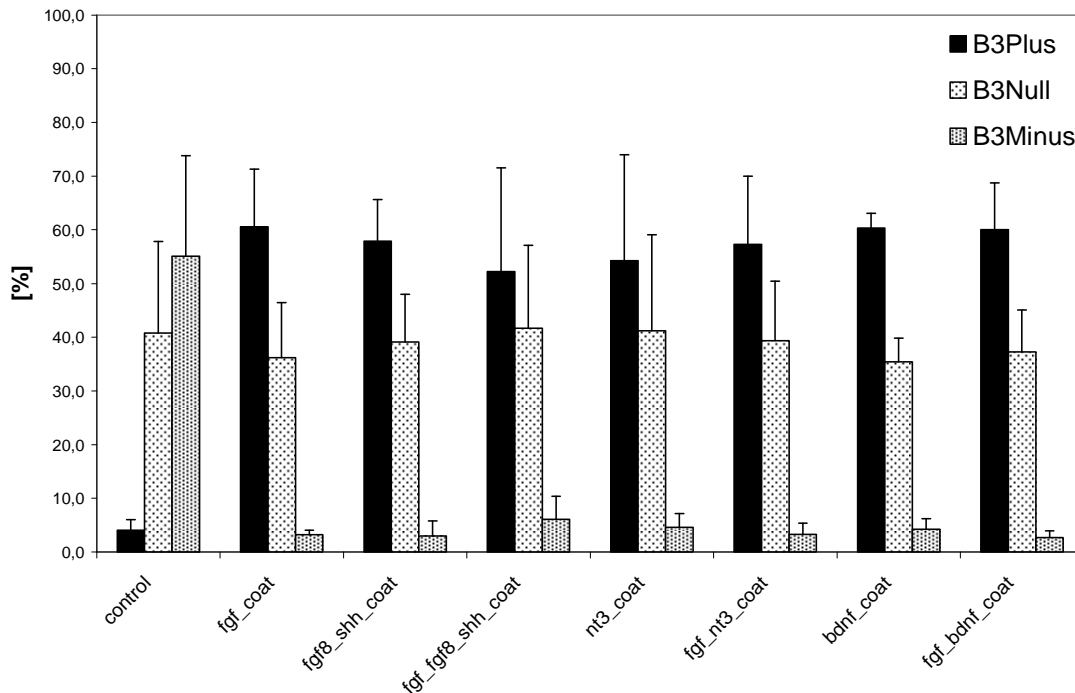


Abbildung 13: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Zellen auf PLL_PORN_dry beschichteten Permax™ Slides (6 Tage, n = 6) nach "Best off"-Protokoll (Standardmedium MEM, neu eingeführte Wachstumsfaktoren, FCS 1%). *Control*: ohne coat, kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Wir reduzierten den Serumanteil auf ein Minimum. Die neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH wurden gegen bekannte neurotrophe Wachstumsfaktoren getestet. Neben unbeschichteten *Slides* interessierte ferner der zusätzliche Effekt einer PLL/PORN-Beschichtung mit Trocknung (*dry*).

Tabelle 30: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	FGF-2_coat	51.74	0.000	40.90	62.57
	FGF-8b/SHH_coat	52.74	0.000	42.65	62.84
	FGF-2/FGF-8b/SHH_coat	48.09	0.000	37.32	58.86
	NT-3_coat	50.44	0.000	39.66	61.23
	FGF-2/NT-3_coat	48.49	0.000	37.65	59.32
	BDNF_coat	52.07	0.000	40.20	63.94
	FGF-2/BDNF_coat	51.24	0.000	40.40	62.07
	FGF-2	36.29	0.000	26.25	46.34
	FGF-8b/SHH	38.03	0.000	27.92	48.13
	FGF-2/FGF-8b/SHH	38.84	0.000	28.75	48.94
	NT-3	28.87	0.000	18.76	38.97
	FGF-2/NT-3	36.91	0.000	26.80	47.01
	BDNF	20.71	0.000	10.60	30.81
	FGF-2/BDNF	32.95	0.000	22.84	43.05

Alle Experimente der fünften Versuchsreihe waren für die Variable B3Plus gegenüber der Kontrolle hochsignifikant. Dabei zeigte sich der Standardwachstumsfaktor FGF-2 sowie die

Kombination der neu eingeführten Faktoren FGF-8b und SHH in den Versuchsbedingungen ohne Beschichtung den beiden Neurotrophinen überlegen. Für die Kombination der Faktoren BDNF und NT-3 mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 wurde jeweils ein höherer Anteil an vordifferenzierten Zellen erzielt. In Verbindung mit Beschichtung zeigten die verwendeten Wachstumsfaktoren gegenüber dem Kontroll-Experiment im Durchschnitt einen additiven Effekt von > 50% (Tabelle 30). Bei den stark differenzierenden Kulturbedingungen auf beschichteten Permanox™-Slides konnten keine deutlichen Unterschiede mehr zwischen den einzelnen Kulturbedingungen festgestellt werden.

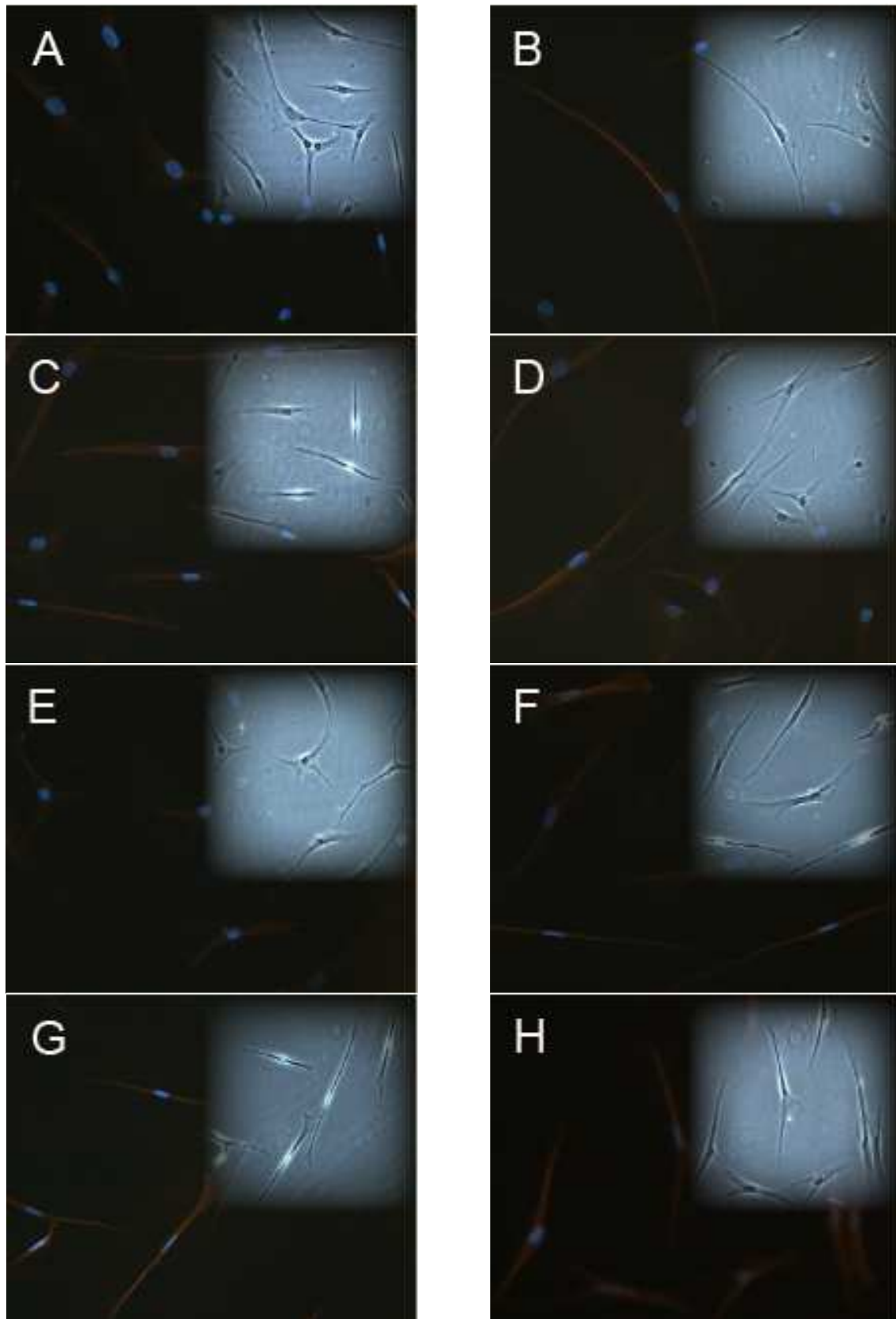


Abbildung 14: Neuronale Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in optimierten Kulturbedingungen (immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin, TRITC-gelabelter Antikörper, rot; oberer Bildrand: Phasenkontrast-Aufnahme): (A) MEM, FGF-2, FCS 1% (B) MEM, BDNF, FCS 1% (C) MEM, NT-3, FCS 1% (D) MEM, FGF-8b/SHH, FCS 1%. (E) MEM, PLL_PORN_dry, FGF-2, FCS 1%. (F) MEM, PLL_PORN_dry, BDNF, FCS 1%. (G) MEM, PLL_PORN_dry, NT-3, FCS 1%. (H) MEM, PLL_PORN_dry, FGF-8b/SHH, FCS 1%. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung: 100-fach.

4.5. Einflussfaktoren von Proliferation

4.5.1. Einfluss des Mediums

Der Proliferations-Index (= PI) für die in Versuchsreihe 1 verwendeten unterschiedlichen Medien und Zusätze ist in Abbildung 15 dargestellt.

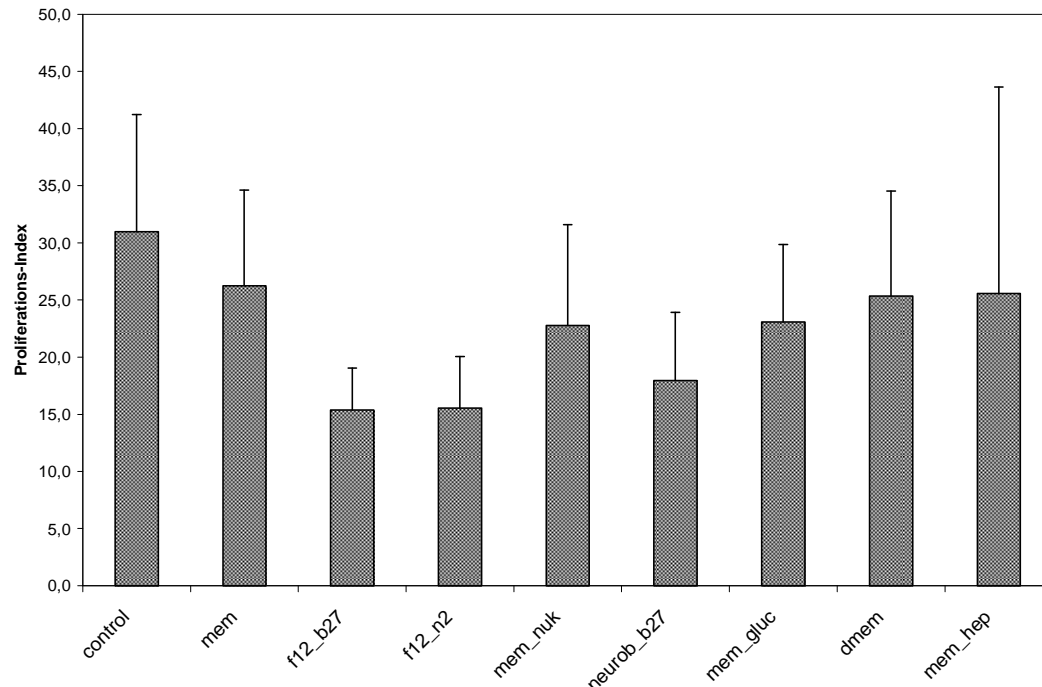


Abbildung 15: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in unterschiedlichen Medien (FGF-2, FCS 20%). *Control*: kein FGF-2, MEM, FCS 20%. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung.

Bezugsstufe in Modell 1 war die Negativkontrolle der Versuchsreihe 5. Die Experimente, die das Medium F12 oder Neurobasal™ mit den Zusätzen B27 oder N2 enthielten, zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Tabelle 31). Offensichtlich ist es so, dass die Proliferation in den Experimenten mit den Zellkulturzusätzen B27 und N2 in etwa der in der Kontrollbedingung der Versuchsreihe 5 vergleichbar war. Für die anderen Kulturbedingungen der ersten Versuchsreihe ergaben sich im Analysemodell 1 signifikante Unterschiede zur Bezugsstufe, wahrscheinlich nur ein Hinweis darauf, dass die Kontroll-Experimente hinsichtlich Proliferation nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind.

Tabelle 31: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	MEM	15.92	0.000	8.52	20.16
	MEM_glc	12.76	0.001	5.36	19.84
	MEM_nuk	12.44	0.001	5.04	24.52
	MEM_hep	16.60	0.000	8.68	22.44
	DMEM	15.04	0.000	7.64	12.46
	F12_B27	5.06	0.179	-2.34	15.04
	F12_N2	5.22	0.166	-2.18	12.62
	Neurob_B27	7.64	0.043	0.24	19.47

4.5.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren

Versuchsreihe 2 untersuchte verschiedene Wachstumsfaktoren. Drei Kulturbedingungen wiesen einen reduzierten Serumanteil von 1% auf. Für den PI ergab sich folgendes Bild:

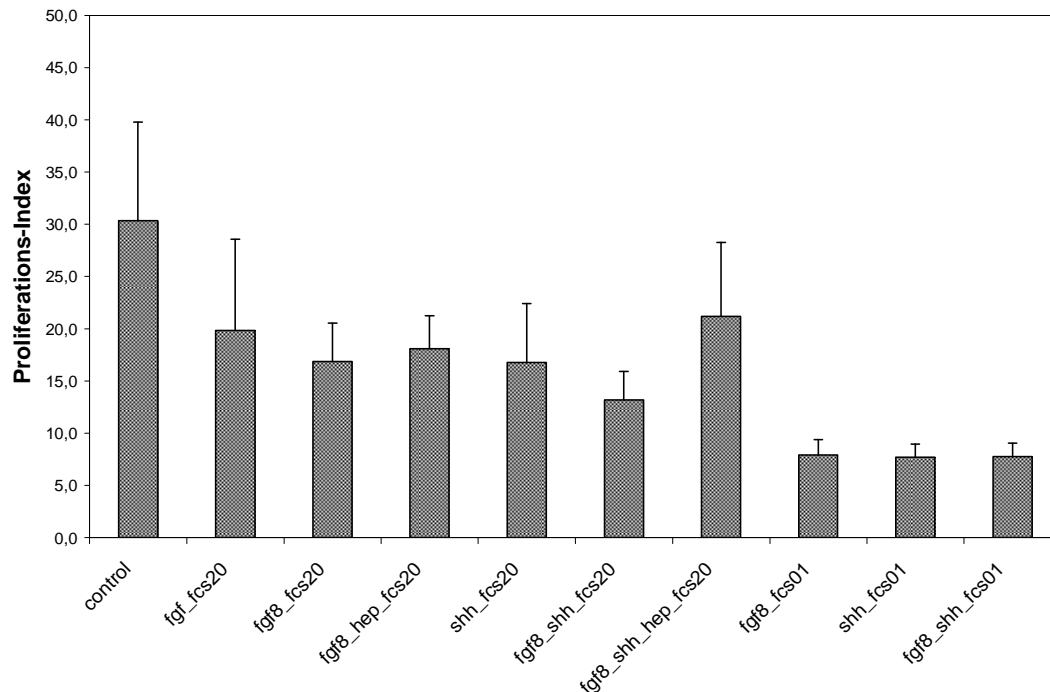


Abbildung 16: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in Anwesenheit unterschiedlicher Wachstumsfaktoren bei variierendem Serumanteil. Standardmedium: MEM. *Control*: kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung.

Eindeutig positive Effekte einzelner Faktoren gegenüber der Bezugsstufe konnten nicht nachgewiesen werden. **In den einzelnen Versuchen wirkten sich insbesondere die Kulturbedingungen mit *minimal-serum-condition* negativ auf das Wachstum der Zellen aus.** Statistische Unterschiede ergaben sich für die Experimente mit reduziertem Serumanteil und den neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH sowie die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren. Nach den Effekt-Schätzern der multivariaten Analyse zeigte sich in diesen Kulturbedingungen im Durchschnitt 10% weniger Proliferation gegenüber der Kontrolle (Tabelle 32).

Tabelle 32: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	FGF-2	2.17	0.529	-4.62	8.97
	FGF-8b	-0.79	0.820	-7.58	6.01
	FGF-8b/Hep	0.43	0.900	-6.36	7.23
	SHH	-0.91	0.793	-7.70	5.89
	FGF-8b/SHH	-3.02	0.415	-10.30	4.27
	FGF-8b/SHH/Hep	3.51	0.309	-3.28	10.31
	FGF-8b/FCS 1%	-9.75	0.005	-16.54	-2.95
	SHH/FCS 1%	-10.65	0.004	-17.84	-3.46
	FGF-8b/SHH/FCS 1%	-10.63	0.004	-17.817	-3.44

4.5.3. Einfluss der Beschichtung

In der dritten Versuchsreihe interessierte der Einfluss der Beschichtung und unterschiedlicher Trocknungsgrade. Die Berechnung des PI für diese Kulturbedingungen stellte sich so dar:

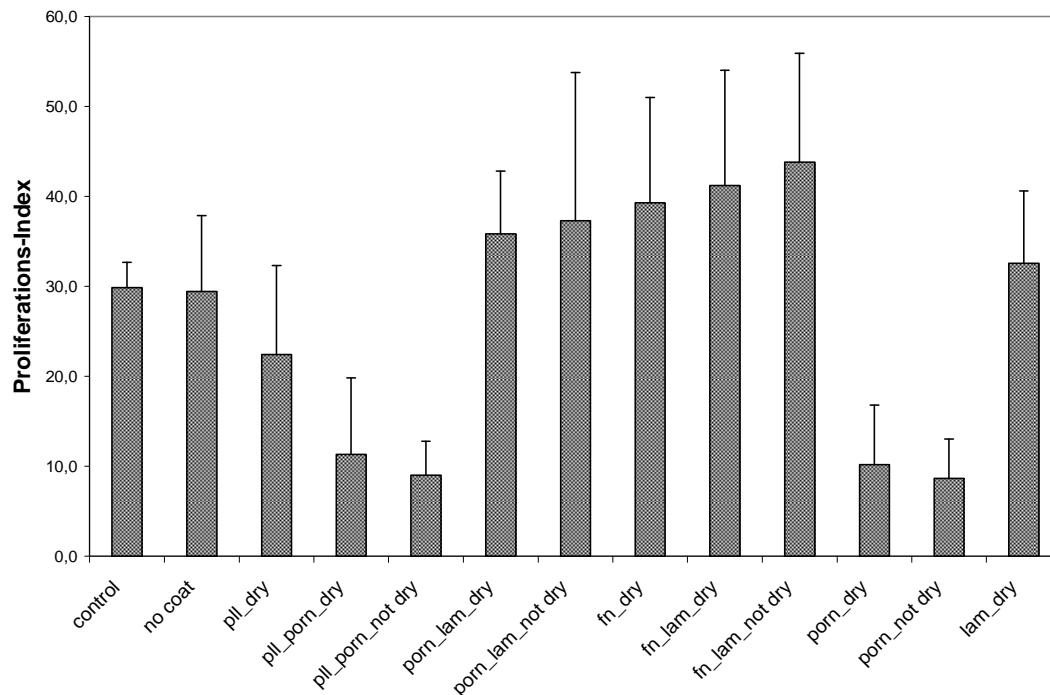


Abbildung 17: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in Anwesenheit unterschiedlicher Beschichtungsmaterialien und bei unterschiedlichen Trocknungsgraden (keine Trocknung, bzw. >2 bis >6h Trocknung bei RT). Standardkulturbedingung: MEM, FCS 20%, FGF-2. *Control*: ohne *coat* und ohne FGF-2. *No-coat-control*: ohne *coat*, aber mit FGF-2. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Statistische Unterschiede gegenüber der Bezugsstufe ergeben sich nahezu für alle Experimente dieser Versuchsreihe (Tabelle 33). Lediglich für die Beschichtung mit PLL ergab sich kein Unterschied zum Kontroll-Experiment. Für die Kulturbedingung ohne Beschichtung (*no-coat-control*) ergab sich gegenüber der Kontrollbedingung ohne Wachstumsfaktor ein zusätzlicher additiver Effekt von 9%. Dieser Befund ist nicht überzubewerten, da die Kontroll-Experimente der unterschiedlichen Versuchsreihen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Einen **deutlich positiven Proliferationsdruck übten die Beschichtungen mit LAM und FN aus**. Die kombinierte Beschichtung von FN und LAM ergab keine zusätzlichen Effekte, die Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denen der Beschichtung mit FN. Den stärksten Effekt zeigte die kombinierte Beschichtung FN und LAM ohne Trocknungsgrad mit einem im Durchschnitt zusätzlichen additiven Effekt von 20% gegenüber der Bezugsstufe. Der Trocknungsgrad scheint aber einen marginalen Einfluss zu haben. Negativ auf die Proliferation wirkten sich Beschichtungen auf der Basis von PORN aus. Die inhibierenden Effekte konnten mit der gleichzeitigen Verwendung von LAM neutralisiert werden. **In der Kombination mit PLL zeigte PORN einen ähnlich inhibierenden Effekt wie bei alleiniger Verwendung**. Den stärksten negativen Effekt übte die Beschichtung PLL_PORN ohne Trocknungsgrad aus mit im Durchschnitt 12% weniger Proliferation gegenüber der Kontrolle.

Tabelle 33: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	No coat	8.89	0.012	2.00	15.79
	PLL_dry	2.61	0.490	-4.82	10.03
	PLL_PORN_dry	-9.13	0.028	-17.25	-1.01
	PLL_PORN_not_dry	-12.55	0.001	-19.80	-5.29
	PORN_LAM_dry	15.29	0.000	8.40	22.19
	PORN_LAM_not_dry	16.73	0.000	9.84	23.63
	FN_dry	18.73	0.000	11.84	25.63
	FN_LAM_dry	17.83	0.000	9.86	25.80
	FN_LAM_not_dry	20.43	0.000	12.46	28.40
	PORN_dry	-10.90	0.010	-19.12	-2.68
	PORN_not_dry	-11.17	0.003	-18.60	-3.74
	LAM_dry	10.89	0.004	3.50	18.27

4.5.4. Einfluss des Serumanteils

Untersuchungsgegenstand der vierten Versuchsreihe war der Einfluss des Serumanteils auf die Proliferation der Zellen. Für das Medium F12 stellte sich der Einfluss auf die Proliferation für die vier untersuchten Serumstufen so dar:

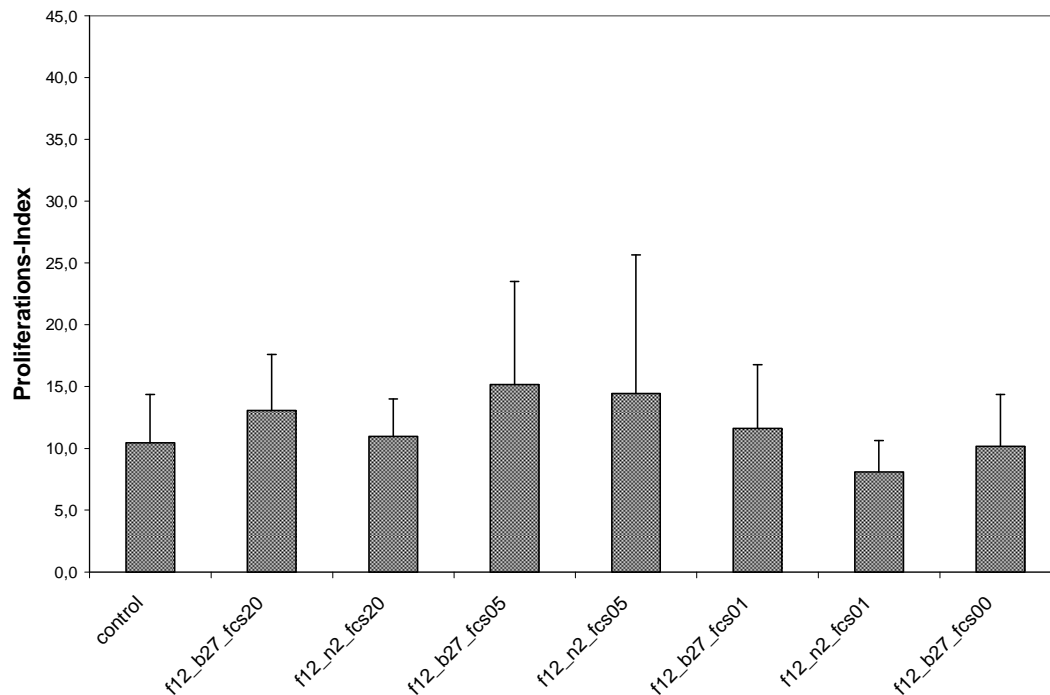


Abbildung 18: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in F12-Medium bei variierendem Serumanteil. Control: kein FGF-2, FCS 5%. Angaben in MW ± Standardabweichung.

Für die unterschiedlichen Serumanteile in MEM-Medium ergab sich im Blick auf die Proliferation dieses Bild:

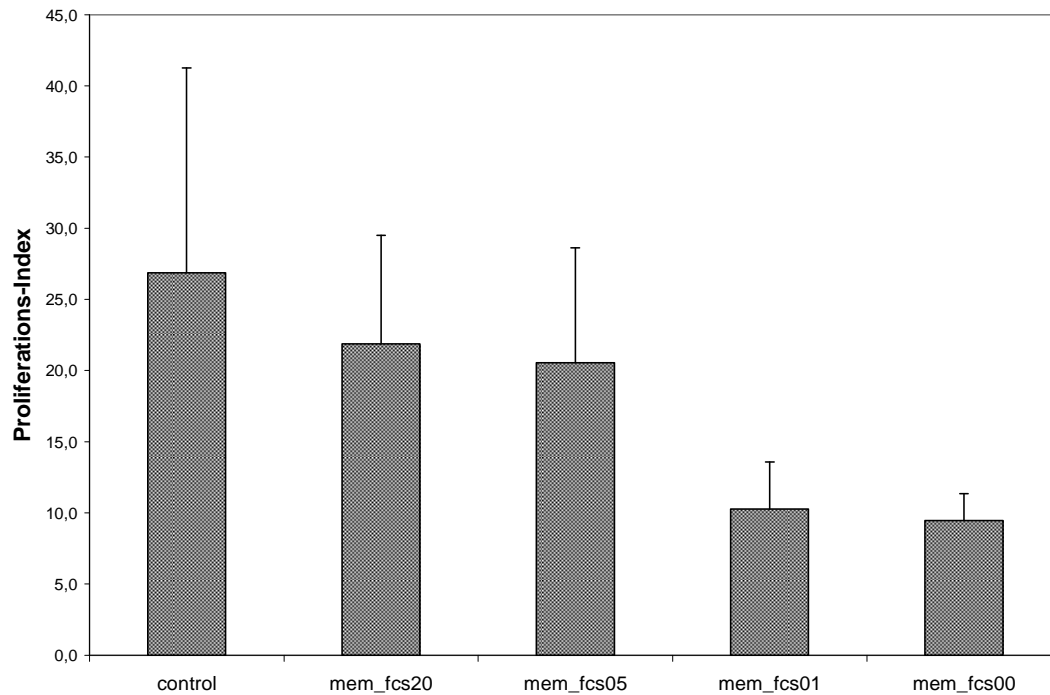


Abbildung 19: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 5) in MEM-Medium bei variierendem Serumanteil. *Control:* kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung.

Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber den Kulturbedingungen der Kontrolle zeigten die Experimente mit minimalem bzw. ohne Serumanteil (Tabelle 34). Der **Serumentzug übte im Durchschnitt, verglichen mit den Bedingungen der Bezugsstufe, einen inhibierenden Effekt von 6-10% auf die Zellen aus.** In den übrigen Experimenten waren die Unterschiede gegenüber der Bezugsstufe nicht ausreichend deutlich.

Tabelle 34: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	F12_B27/FCS 20%	-4.54	0.216	-11.74	2.67
	F12_N2/FCS 20%	-4.70	0.206	-12.00	2.61
	F12_B27/FCS 5%	-2.07	0.550	-8.88	4.74
	F12_N2/FCS 5%	-4.11	0.301	-11.92	3.71
	F12_B27/FCS 1%	-6.23	0.090	-13.44	0.98
	F12_N2/FCS 1%	-9.15	0.009	-15.96	-2.34
	F12_B27/FCS 0%	-7.68	0.037	-14.89	-0.48
	MEM/FCS 20%	4.65	0.180	-2.16	11.46
	MEM/FCS 5%	2.72	0.458	-4.49	9.93
	MEM/FCS 1%	-6.95	0.046	-13.76	-0.14
	MEM/FCS 0%	-8.95	0.026	-16.81	-1.08

4.5.5. Einfluss der Kombination der Faktoren im "Best-Off"-Protokoll

Versuchsreihe 5 kombinierte unterschiedliche Kulturfaktoren miteinander. Der Einfluss auf die Proliferation stellte sich so dar:

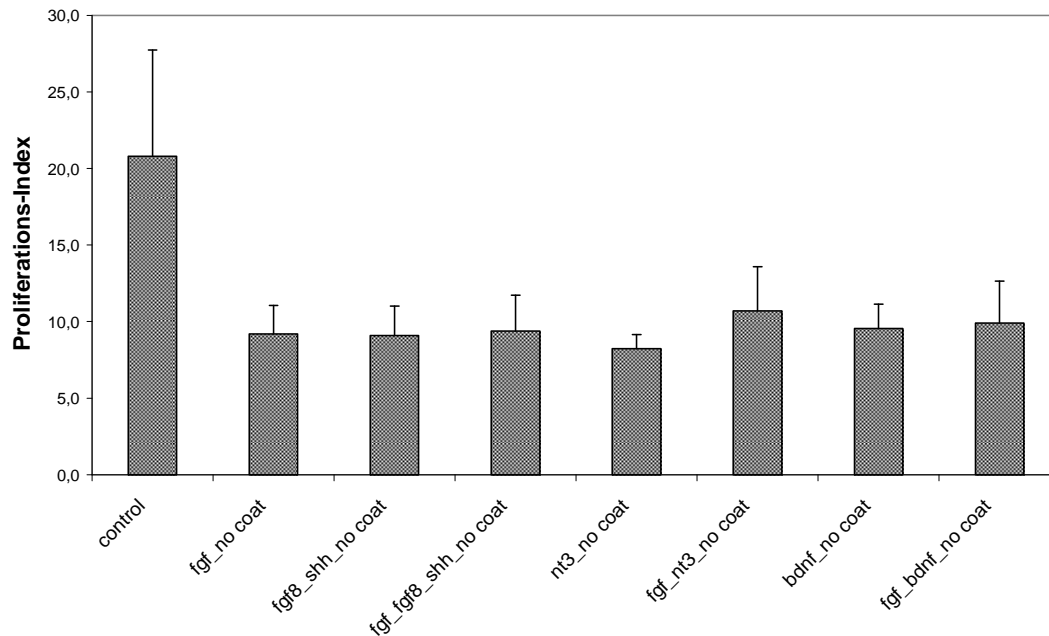


Abbildung 20: PI mesenchymaler Zellen auf Permanox™-Slides (6 Tage, n = 6) nach "Best-off"-Protokoll (Standardmedium MEM, neu eingeführte Wachstumsfaktoren, FCS 1%). *Control:* kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

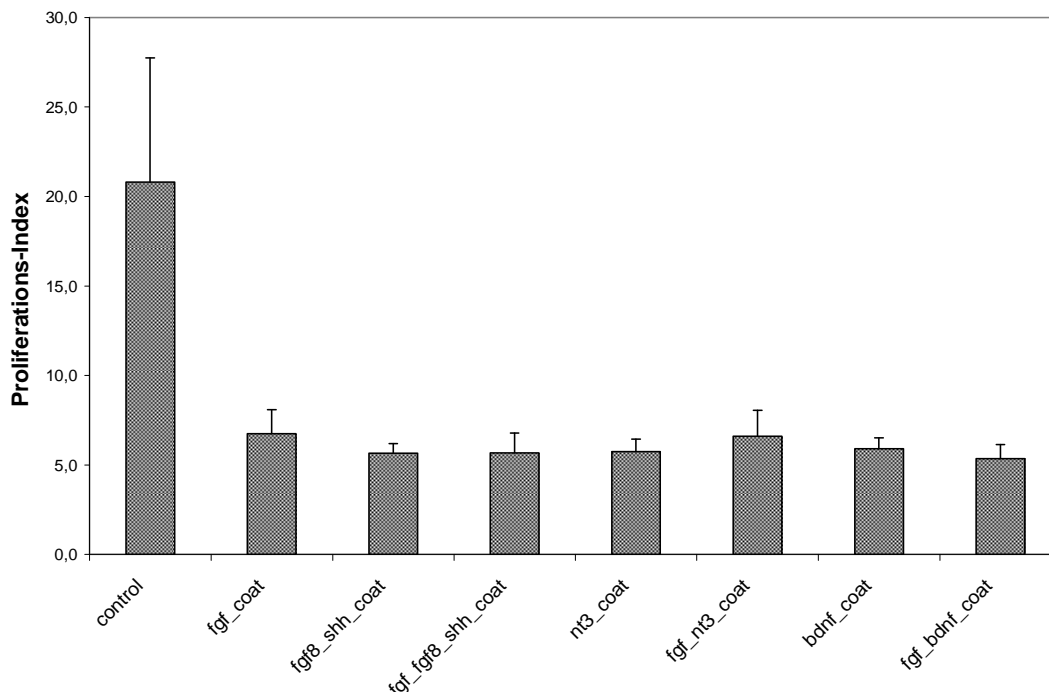


Abbildung 21: PI mesenchymaler Zellen auf PLL/PORN_dry beschichteten Permanox™-Slides (6 Tage, n = 6) nach "Best-off"-Protokoll (Standardmedium MEM, neu eingeführte Wachstumsfaktoren, FCS 1%). *Control:* ohne coat, kein FGF-2, FCS 20%. Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung.

Die Ergebnisse hinsichtlich Proliferation waren für alle Kulturbedingungen im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant (Tabelle 35). **Die Kulturbedingungen übten einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation der Zellen aus.** Dabei zeigen die B-Werte der Effekt-Schätzer für die Experimente mit beschichteten OT tendenziell negativere Werte, was für einen zusätzlichen inhibierenden Effekt der Beschichtung spricht. **Das inverse Verhältnis von Proliferation und Differenzierung, wie es bereits bei der globalen Datenanalyse deutlich wurde, spiegelt sich also auch auf Ebene der Versuchsreihen wieder.**

Tabelle 35: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 1) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 1 (Bezugsstufe war das Kontroll-Experiment der fünften Versuchsreihe).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	FGF-2_coat	-14.00	0.000	-21.07	-6.93
	FGF-8b/SHH_coat	-14.75	0.000	-21.34	-8.16
	FGF-2/FGF-8b/SHH_coat	-13.97	0.000	-21.00	-6.94
	NT-3_coat	-15.74	0.000	-22.78	-8.70
	FGF-2/NT-3_coat	-14.15	0.000	-21.22	-7.08
	BDNF_coat	-16.40	0.000	-24.15	-8.66
	FGF-2/BDNF_coat	-15.40	0.000	-22.47	-8.32
	FGF-2	-12.54	0.000	-19.10	-5.99
	FGF-8b/SHH	-12.05	0.000	-18.65	-5.45
	FGF-2/FGF-8b/SHH	-11.03	0.001	-17.62	-4.44
	NT-3	-12.91	0.000	-19.51	-6.31
	FGF-2/NT-3	-10.45	0.002	-17.05	-3.85
	BDNF	-11.59	0.001	-18.19	-4.99
	FGF-2/BDNF	-11.23	0.001	-17.83	-4.63

4.6. Spezielle Fragestellungen

Um die isolierten Effekte der verwendeten Substanzen hinsichtlich Differenzierung und Proliferation zu analysieren, wurden zur statistischen Auswertung der Daten andere Analysemodelle herangezogen, die nicht den Versuchsaufbau abbilden, sondern die Verwendung der Substanzen. Der durchschnittliche Effekt der jeweiligen Substanz wird dabei als Parameter-Schätzer herausgerechnet und erlaubt eine quantitative Analyse. Der Vergleich der Einzelexperimente (Modell 1) erlaubte nur den Vergleich der jeweiligen Kulturbedingung mit der Bezugsstufe. Die statistischen Modelle der quantitativen Datenanalyse erlauben dagegen die Beurteilung des durchschnittlichen Effekts der jeweiligen Substanz auf die Variablen Differenzierung und Proliferation.

4.6.1. Effekte von Serum und Kulturmedium auf Differenzierung und Proliferation

Für die Beurteilung der durchschnittlichen Effekte von Kulturmedium und verschiedener Konzentrationen von FCS auf Proliferation und neuronale Differenzierung wurden die Datensätze über alle Versuchsreihen hinweg in einem eigenen Modell statistisch ausgewertet (Modell 2). Die jeweiligen Effekt-Schätzer geben an, um wieviel Einheiten die jeweilige Substanz die Variable für Differenzierung (B3Plus) oder Proliferation (PI) additiv oder inhibierend gegenüber der Bezugsstufe verändert. Dabei zeigten sich für die verwendeten Medien NeurobasalTM, F12 und DMEM gegenüber dem Standardmedium MEM als Referenz keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich neuronaler Differenzierung (Tabelle 36).

Experimente, in denen das Medium F12 und Neurobasal™ Verwendung fand, lassen allerdings einen zusätzlichen additiven Effekt der Kulturbedingung erkennen.

Tabelle 36: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 2) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 2 (Bezugsstufe waren die Versuchsbedingungen mit MEM-Medium).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	DMEM	- 0.03	0.996	-12.60	12.66
	Neurob_B27	5.25	0.414	-7.38	17.88
	F12	3.43	0.253	-2.46	9.32

Ein auffälliger Unterschied resultierte für die Variable Proliferation. **Im Vergleich zu MEM proliferierten die Zellen in F12-Medium signifikant schlechter.** Im Schnitt war der PI für die Kulturbedingungen mit F12-Medium im Schnitt 7% niedriger (Tabelle 37). Ebenso für Neurobasal™ konnte als Trend ein negativer Effekt auf das Wachstum der Zellen festgestellt werden; dieser Unterschied war allerdings nicht mehr signifikant. Kein nennenswerter Unterschied gegenüber der Bezugsstufe ergab sich für das Medium DMEM.

Tabelle 37: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 2) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 2 (Bezugsstufe waren die Versuchsbedingungen mit MEM-Medium).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	DMEM	0.33	0.930	-7.07	7.72
	Neurob_B27	-7.07	0.061	-14.47	0.32
	F12	-7.35	0.000	-10.80	-3.89

Untersucht man isoliert die Versuchsreihe 1 und wählt als *Baseline* das Experiment mit FGF-2 (Modell 4), so können die Effekte der Experimente direkt als additiver Effekt der jeweiligen Substanzen zu FGF-2 gedeutet werden. Dabei ergaben sich für die Experimente, die das Medium F12 mit den Zusätzen B27 und N2 enthielten, signifikante Unterschiede zur Bezugsstufe. Für das Medium Neurobasal™ mit B27 war ebenso ein additiver Effekt hinsichtlich des Anteils B3-positiver-Zellen nachzuweisen, der Unterschied zur Bezugsstufe erreichte allerdings kein Signifikanzniveau (Tabelle 38).

Tabelle 38: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 4) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 4 (Bezugsstufe war die Standardkulturbedingung mit FGF-2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	F12_B27	10.76	0.003	4.01	17.51
	F12_N2	10.48	0.004	3.73	17.23
	Neurob_B27	6.54	0.057	-0.21	13.29

Für die Versuchsbedingungen der Versuchsreihe 1, die die neuronale Differenzierung besonders förderten, war ein entsprechend inhibierender Effekt auf die Proliferation nachzuweisen. Experimente, die das Medium F12 und die Zusätze B27 und N2 enthielten, zeigten im Vergleich zu den Versuchsbedingungen mit FGF-2 eine zusätzliche Inhibition der Proliferation von 10% (Tabelle 39). Etwas weniger deutlich und nicht mehr signifikant war der inhibierende Effekt der Kulturbedingung mit dem Medium Neurobasal™ und B27.

Tabelle 39: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 4) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 4 (Bezugsstufe war die Standardkulturbedingung mit FGF-2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	F12_B27	-10.86	0.019	-19.79	-1.93
	F12_N2	-10.70	0.021	-19.63	-1.77
	Neurob_B27	-8.28	0.068	-17.21	0.65

Man kann die Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass die **Medien F12 und Neurobasal™ weniger die Proliferation und eher die neuronale Differenzierung begünstigen**. Die Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen der Auswertungen an anderer Stelle. Es ergeben sich also über die statistischen Analysen hinweg keine sachwissenschaftlichen Widersprüche. Allerdings war die positive Wirkung hinsichtlich neuronaler Differenzierung nicht in allen Analysemodellen signifikant und zeigte sich daher lediglich als Trend.

Für die Verwendung von FCS ergab sich gegenüber der Nicht-Anwesenheit von Serum (Bezugsstufe) kein signifikanter Unterschied für die Variable B3Plus. Dennoch zeigte sich ein Trend dahingehend, dass **Kulturbedingungen mit hohem Serumanteil weniger die Differenzierung fördern, während sich Kulturbedingungen mit einem minimalen Serumanteil günstig auf die Differenzierung auswirken**. Ein 1% Serumanteil veränderte den Anteil B3-positiver Zellen in der Versuchsbedingung im Durchschnitt um 7% additiv gegenüber der *Baseline*. Für den 20% Serumanteil zeigte sich im Schnitt eine 11% Reduktion der differenzierenden Zellen (Tabelle 40).

Tabelle 40: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 2) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 2 (Bezugsstufe waren die Versuchsbedingungen ohne Serumanteil).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	FCS 20%	-10.90	0.059	-22.21	0.41
	FCS 5%	-8.18	0.175	-20.01	3.66
	FCS 1%	6.69	0.248	-4.69	18.08

Betrachtet man den Effekt der Kulturbedingungen auf die Proliferation so ergibt sich ein inverses Bild: **Ein hoher Serumanteil wirkte sich günstig auf die Proliferation aus**. Gegenüber der *Baseline* zeigte sich für einen 20% Serumanteil ein additiver Effekt von 11%, für den 5% Anteil von 7% (Tabelle 41). Die Unterschiede waren statistisch signifikant. Ein 1% Serumanteil machte gegenüber der Nicht-Anwesenheit von Serum keinen Unterschied.

Tabelle 41: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 2) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 2 (Bezugsstufe waren die Versuchsbedingungen ohne Serumanteil).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	FCS 20%	10.73	0.002	4.11	17.36
	FCS 5%	7.06	0.046	0.13	13.99
	FCS 1%	-0.37	0.912	-7.04	6.29

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Serumanteil die Proliferation der Zellen erheblich beeinflusst. Ein hoher Serumanteil wirkt sich dabei tendenziell inhibierend auf die neuronale Differenzierung aus.

4.6.2. Effekte des Wachstumsfaktors FGF-2 auf Differenzierung und Proliferation

Um den isolierten Effekt des Wachstumsfaktors FGF-2 auf Differenzierung und Proliferation zu untersuchen, wurden über alle Versuchsreihen hinweg Kulturbedingungen mit MEM und 20% Serumanteil untersucht, die nur FGF-2 als Wachstumsfaktor enthielten. Als Bezugsstufe dienten die Experimente der Versuchsreihen, die neben MEM und 20% Serumanteil keinen Wachstumsfaktor und keine weiteren Kulturzusätze enthielten. Da sich die Bezugsstufe lediglich durch die Nicht-Anwesenheit des Wachstumsfaktors unterscheidet, kann die Differenz zu den Kontrollbedingungen als Effekt des Wachstumsfaktors gewertet werden. Gegenüber den Kontrollbedingungen zeigte sich für die Variable **B3Plus in den Kulturbedingungen mit FGF-2** im Durchschnitt ein **additiver Effekt von 19%** (Tabelle 42). Der Unterschied war hochsignifikant.

Tabelle 42: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 3) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 3 (Bezugsstufe waren die Kulturbedingungen ohne den Wachstumsfaktor FGF-2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	FGF-2	18.61	0.000	15.14	22.08

Die Proliferation wurde durch den Wachstumsfaktor weniger deutlich beeinflusst, der Unterschied war dennoch signifikant. Gegenüber den Kontrollbedingungen zeigte sich ein inhibierender Einfluss auf die Proliferation: die Zellen zeigten **in Anwesenheit von FGF-2 gegenüber der Baseline eine im Durchschnitt um 5% reduzierte Proliferation** (Tabelle 43).

Tabelle 43: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 3) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 3 (Bezugsstufe waren die Kulturbedingungen ohne den Wachstumsfaktor FGF-2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	FGF-2	-5.16	0.011	-9.02	-1.30

4.6.3. Effekte der Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH und von Heparin

Um die durchschnittlichen Effekte der neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH zu ermitteln, wurden die Experimente der Versuchsreihe 2 in einem eigenen statistischen Modell untersucht (Modell 5). Ausserdem interessierte die Frage, ob Heparin-faktor einen Effekt auf Differenzierung oder Proliferation ausübt. In der statistischen Auswertung wurden daher die Kulturbedingungen, in denen der untersuchte Faktor verwendet wurde, den Versuchsbedingungen ohne den jeweiligen Faktor als Bezugsstufe gegenübergestellt. Der Effekt des Wachstumsfaktors FGF-2 kann als interner Vergleichsmassstab verstanden werden. Aufgrund des kleinen Datensatzes sind die Ergebnisse allerdings mit Zurückhaltung zu interpretieren. Zusätzlich werden die Effekte der Wachstumsfaktoren in diesem Modell vom Serumanteil überlagert, der in einigen Versuchsbedingungen auf einen Anteil von 1% reduziert war.

Für die Kulturbedingungen, in denen FGF-8b und SHH als Wachstumsfaktor vorhanden war, zeigten sich deutliche Effekte hinsichtlich neuronaler Differenzierung. **Für FGF-8b** ergab sich ein **additiver Effekt von 15%**, **für SHH von 10%** (Tabelle 44). **Den grössten additiven Effekt übte allerdings der Standardwachstumsfaktor FGF-2 aus.** Die Unterschiede sind für alle untersuchten Wachstumsfaktoren hinsichtlich deren Nicht-

Anwesenheit signifikant. Dagegen hatte die **Anwesenheit von Heparin** einen **tendenziell inhibierenden Einfluss auf die Differenzierung**.

Tabelle 44: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 5) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 5 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	FGF-2	17.31	0.001	7.46	27.16
	FGF-8b	14.94	0.000	8.40	21.48
	SHH	10.39	0.001	4.81	15.97
	Heparin	-4.99	0.196	-12.67	2.69

Die Ergebnisse hinsichtlich Proliferation der Zellen verhielten sich entsprechend spiegelbildlich. Die Anwesenheit von FGF-2 wirkte sich inhibierend aus, der Unterschied gegenüber dessen Nicht-Anwesenheit erreichte allerdings kein Signifikanzniveau. **Die neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH liessen die Zellen auffällig weniger proliferieren.** Die Zugabe von **Heparin** zeigte gegenüber der Nicht-Anwesenheit **keinen Einfluss hinsichtlich Proliferation** (Tabelle 45).

Tabelle 45: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 5) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 5 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 2).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	FGF-2	-4.65	0.134	-10.81	1.50
	FGF-8b	-5.71	0.007	-9.80	-1.62
	SHH	-3.97	0.027	-7.45	-0.48
	Heparin	2.84	0.238	-1.96	7.64

4.6.4. Zusätzliche Effekte extrazellulärer Matrixproteine

Um die Effekte von Beschichtung und Trocknungsgrad zu beurteilen, wurden die Experimente der Versuchsreihe 3 eigens ausgewertet (Modell 6). Die statistische Analyse analysiert den zusätzlichen Effekt eines Faktors gegenüber dessen Nicht-Anwesenheit. Die Beschichtungen mit PLL und FN zeigten keinen statistisch signifikanten Effekt hinsichtlich des Anteils B3-positiver Zellen. Konkordant zu den Ergebnissen der Einzelauswertung zeigte sich ein **deutlich positiver Einfluss der Beschichtung mit PORN**. Die Beschichtung erhöhte den Anteil der Zellen, die den neuronalen Marker exprimierten, im Durchschnitt um 10% (Tabelle 46). Dagegen übte die Anwesenheit von **LAM einen inhibierenden Effekt** auf den Differenzierungsgrad der Zellen aus. Der Anteil der B3-positiven Zellen fiel im Vergleich mit den Experimenten, die kein LAM verwendeten, im Schnitt 12% geringer aus. Zur Beurteilung des Trocknungsgrads wurden Kulturbedingungen, für die keine Trocknungszeit vorgesehen war als Bezugsstufe gewählt und mit den Experimenten verglichen, denen eine Trocknungszeit für das Beschichtungsmaterial vorgeschaltet war. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Bezugsstufe. **Die Trocknung scheint demnach das Ergebnis der Kulturbedingung nicht auffällig zu beeinflussen.**

Tabelle 46: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 6) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 6 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 3).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
B3Plus	PLL	5.31	0.227	-3.46	14.08
	PORN	10.71	0.019	1.88	19.53
	LAM	-12.34	0.001	-19.57	-5.11
	FN	-6.29	0.209	-16.28	3.69
	Dry	-4.68	0.162	-11.32	1.96

Die Ergebnisse hinsichtlich der Variable Proliferation unterstreichen die Befunde der Auswertung der Einzelexperimente: die **Matrixproteine FN und LAM förderten im Gegensatz zu den synthetischen Substanzen PLL und PORN besonders das Wachstum der Zellen** (Tabelle 47). Im Schnitt proliferierten die Zellen in Anwesenheit von LAM um 15% besser. In Kulturbedingungen mit FN als Beschichtungsmaterial proliferierten die Zellen um 11% besser. Für PLL und PORN zeigten die Parameter-Schätzer negative Werte, ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Der Trocknungsgrad selbst beeinflusste die Zellproliferation nicht.

Tabelle 47: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 6) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 6 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 3).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	PLL	-3.00	0.501	-11.96	5.95
	PORN	-4.51	0.318	-13.53	4.51
	LAM	15.30	0.000	7.92	22.69
	FN	10.58	0.042	0.38	20.77
	Dry	2.86	0.398	-3.92	9.65

4.6.5. Effekte der Zellkulturzusätze B27 und N2

Die Auswertung ist dadurch erschwert, dass die Aufsplittung der einzelnen Einflussfaktoren aufgrund eines inkompletten Blockdesigns in Versuchsreihe 1 nicht möglich ist. Um die Effekte der verwendeten Zellzusätze dennoch zu bestimmen, wurden die Kulturbedingungen der Versuchsreihe 4, in denen die beiden Supplemente häufig verwendet wurden, in einem eigenen statistischen Modell ausgewertet (Modell 7). Untersucht wurde der Effekt der Zellkulturzusätze gegenüber deren Nicht-Anwesenheit. In den Versuchsbedingungen wurden die Medien MEM und F12 verwendet. **Für die Zellkulturzusätze** konnten hinsichtlich der untersuchten Variablen **keine signifikanten Unterschiede** erzielt werden (Tabelle 48 & 49). Die Ergebnisse werden allerdings durch unterschiedliche Serumstufen in den Versuchsbedingungen überlagert.

Tabelle 48: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 7) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 7 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 4).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	B27	-3.72	0.442	-13.41	5.98
	N2	-0.65	0.907	-11.83	10.53

Tabelle 49: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 7) für Proliferation (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 7 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 4).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
PI	B27	2.78	0.393	-3.73	9.28
	N2	0.88	0.813	-6.62	8.38

4.6.6. Effekte der Wachstumsfaktoren und von Beschichtung bei *minimal-serum-condition*

Versuchsreihe 5 untersuchte verschiedene Wachstumsfaktoren und eine PLL/PORN-Beschichtung gegenüber unbeschichteten *Slides* unter *minimal-serum-condition*. Eine isolierte statistische Analyse dieser Versuchsreihe erlaubt die Beurteilung der mittleren Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren und der Beschichtung gegenüber deren Nicht-Anwesenheit (Modell 8). Der direkte Vergleich der Wachstumsfaktoren untereinander ergab, dass **FGF-2 und die neu eingeführten Faktoren FGF-8b und SHH gegenüber den etablierten neurotrophen Wachstumsfaktoren NT-3 und BDNF einen zusätzlichen additiven Effekt hinsichtlich neuronaler Differenzierung zeigen** (Tabelle 50). Dieser Unterschied erreichte allerdings kein Signifikanzniveau. Ebenso übte die **Beschichtung einen deutlich positiven Einfluss auf die neuronale Differenzierung der Zellen** aus. Gegenüber den Kulturbedingungen ohne Beschichtung konnte der Anteil B3-positiver Zellen in den experimentellen Bedingungen im Mittel um 17% gesteigert werden.

Tabelle 50: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 8) für neuronale Differenzierung (abhängige Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 8 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 5).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				Lower Bound	Upper Bound
B3Plus	FGF-2	4.21	0.081	-0.54	8.95
	FGF-8b/SHH	4.63	0.221	-2.87	12.14
	NT-3	-0.31	0.935	-7.78	7.17
	BDNF	-3.33	0.379	-10.87	4.20
	Coat	17.05	0.000	12.45	21.65

Die Anwesenheit der Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH hatte im Vergleich zu den Kulturbedingungen, in denen der Wachstumsfaktor nicht vorhanden war, in den stark differenzierenden Kulturbedingungen dieser Versuchsreihe keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Proliferation der Zellen (Tabelle 51). Lediglich die Anwesenheit von FGF-2 erreichte knapp Signifikanzniveau. **Die Beschichtung hatte dagegen einen auffällig inhibierenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen.**

Tabelle 51: Statistisches Output der multivariaten Varianzanalyse (Modell 8) für Proliferation (abhängig Variable). B = Parameter-Schätzer. * Statistische Signifikanz im Analysemodell 8 (Bezugsstufe war die Nicht-Anwesenheit des untersuchten Faktors in Versuchsreihe 5).

Variable	Parameter	B	Signifikanz*	95% Konfidenzintervall	
				<i>Lower Bound</i>	<i>Upper Bound</i>
PI	FGF-2	0.77	0.047	1.06	1.54
	FGF-8b/SHH	0.20	0.736	-1.00	1.41
	NT-3	0.28	0.640	-0.92	1.49
	BDNF	0.10	0.864	-1.11	1.32
	Coat	-3.38	0.000	-4.12	-2.64

5. Diskussion

Das Differenzierungspotential adulter Stammzellen des KM ist seit Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Die zahlreichen Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass MSC ein breiteres Differenzierungspotential besitzen, als bislang angenommen wurde. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen differenzieren sie offenbar auch in neuronale Zellen. Aufgrund der *in-vitro* und *in-vivo* demonstrierten Plastizität, der einfachen Gewinnung und Expansion sowie erster Erfolge in klinischen Studien erscheinen MSC des KM als besonders geeignete Kandidaten für neuartige zellbasierte Therapien. Beim Versuch, mesenchymale Stammzellen *in-vitro* zu differenzieren, kommen zahlreiche Zellkulturprotokolle zur Anwendung. Die Palette umfasst die Verwendung unspezifischer Induktoren wie 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin, Dibuturyl-cyclisches Adenosinmonophosphat (Deng et al, 2001) oder Butylhydroxianisol (Woodbury et al, 2000), unterschiedlichste Wachstumsfaktoren, Antioxidantien, Hormone, extrazelluläre Matrixmoleküle sowie gentechnische Methoden (Dezawa et al, 2004), konditionierte Medien (Kuznetsov et al, 1997; Jiang et al, 2003; Joannides et al, 2003; Rivera et al, 2006) und komplexe Kokultursysteme (Sanchez-Ramos et al, 2000; Jiang et al, 2003; Joannides et al, 2003; Abouelfetouh et al, 2004; Bossolasco et al, 2005; Wislet-Gendebien et al, 2005).

Die Beurteilung der unterschiedlichen Studienergebnisse wird dadurch erschwert, dass sich Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen zum Teil erheblich unterscheiden. Dies macht einen Vergleich der verwendeten Protokolle schwierig (Herzog et al, 2003; Croft & Przyborski, 2004). Die Frage, in welchem Ausmass die unterschiedlichen Faktoren die neuronale Differenzierung MSC beeinflussen, lässt sich auf dieser Datenbasis kaum beantworten. Die Mehrzahl der *in-vitro*-Studien zur neuronalen Plastizität MSC wurde zudem an KM-Zellen von Maus und Ratte durchgeführt. Ergebnisse, die bei der Kultivierung von Zellen anderer Spezies erzielt wurden, sind nicht direkt auf die Situation beim Menschen übertragbar. Für die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen bestehen nämlich erhebliche Speziesunterschiede, wie eine Reihe von Studien an neuronalen Stammzellen (Svendsen et al, 1997; Carpenter et al, 1999; Whittemore et al, 1999; Galli et al, 2000) und MSC (Kuznetsov et al, 1997; Javazon et al, 2001) offenbart hat.

Es erschien daher sinnvoll, Effekte unterschiedlicher Kulturbedingungen speziell für humane MSC zu analysieren. Zwar wurde in einigen wenigen Studien der Einfluss einzelner Kulturzusätze beleuchtet, eine breit angelegte Untersuchung wurde bislang aber nicht unternommen. Ziel unserer Arbeit war daher eine systematische Analyse der Effekte unterschiedlicher Kulturbedingungen hinsichtlich ihres Potentials, das Wachstum humaner MSC zu fördern sowie einen neuronalen Phänotyp zu induzieren. Auf der Basis der erzielten Ergebnisse sollte auch geklärt werden, inwieweit sich *in-vitro*-Kulturbedingungen optimieren lassen. Einschliesslich der Vorversuche wurden dazu über 600 Einzelexperimente durchgeführt. Durch **diese Kombination** unterschiedlicher Kulturbedingungen konnten schliesslich nach **sechs Kulturtagen Zellpopulationen mit einem Anteil von bis zu 60% β -III-Tubulin-positiver Zellen mit neuronalem Phänotyp erzeugt werden.**

5.1. Diskussion der Methodik

Die Untersuchung der Einflussfaktoren auf Proliferation und auf die neuronale Differenzierung MSC stellt aufgrund der Komplexität möglicher Einflußfaktoren und diverser technischer und methodischer Probleme eine gegenwärtig nur unvollständig beantwortete Frage dar.

5.1.1. Methodische Herausforderungen

Mesenchymale Stromazellen sind heterogen

Eine möglichst homogene Zellkultur als Starterpopulation ist Voraussetzung für die Vergleichbarkeit einzelner Experimente und die Konfrontation mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Die heterogene Natur MSC macht es gegenwärtig schwierig, diesem Anspruch in vollem Masse zu genügen. Die Heterogenität der Zellpopulation ist ein bislang nicht gelöstes Problem (Hess et al, 2004). Eine weithin als Standard anerkannte Methode zur Isolierung humaner MSC aus dem KM gibt es bislang nicht. Die wohl am häufigsten verwendete Methode ist die Auftrennung über einen Ficoll-Gradienten mit anschließender Selektion der Zellen durch Adhärenz an die Plastikoberfläche des Kulturgefäßes. Aufgrund der Heterogenität der untersuchten Zellpopulation und des erheblichen Einflusses von Isolierungsmethode und Kulturbedingung auf den Phänotyp konnte bislang zwischen den unterschiedlichen Arbeitsgruppen keine Übereinstimmung des Phänotyps MSC erreicht werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass nach zwei Passagen eine relativ homogene Zellpopulation gewonnen werden kann, die mit einer durch technisch aufwendigere Verfahren isolierten Population vergleichbar ist (Tondreau et al, 2004b). In unseren Versuchsreihen wurden MSC durch selektive Adhäsion an unbeschichteten Kunststoff-Zellkulturflaschen gewonnen. In allen Versuchsreihen wurde eine determinierte Zellzahl der zweiten und dritten Passage verwendet. Expressionsanalysen der isolierten und nach einem gängigen Kulturprotokoll expandierten MSC wurden nicht durchgeführt. Bis zur Etablierung neuer spezifischer Marker MSC stellt die Isolierung mittels Plastikadhärenz eine akzeptable Methode dar. Darüberhinaus weisen unsere Ergebnisse noch auf ein weiteres bisher wenig beachtetes Problem hin, nämlich den Einfluß des Spenders. MSC von verschiedenen Spendern zeigten unterschiedliches Proliferations- und Differenzierungsverhalten.

Mesenchymale Stromazellen sind „multidifferenziert“ und reagibel auf die Kulturbedingungen

Eine Reihe von Forschungsgruppen berichtete, dass MSC bereits in unbehandeltem Zustand zu einem geringen Anteil neuro-gliale Marker exprimieren (Deng et al, 2001 & 2006; Woodbury et al, 2002; Tondreau et al, 2004a; Tao et al, 2005; Minguell et al, 2005; Egusa et al, 2005; Bossolasco et al, 2005; Scintu et al, 2006; Blondheim et al, 2006; Lamoury et al, 2006). Woodbury und Kollegen zeigten, dass Zellpopulationen und klonale Zell-Linien MSC ectodermale, endodermale und mesodermale Gene exprimieren und sahen darin Argumente dafür, dass MSC „multi-differenziert“ sind (Woodbury et al, 2002). Diese Beobachtungen passen zu den Beobachtungen vieler Veröffentlichungen, dass MSC Eigenschaften mesodermaler Zelltypen (Chondroblasten, Adipozyten, Osteoblasten, Herzmuskelzellen, endotheliale Gefäßzellen), ectodermaler Zelltypen (neuronale Zellen, Hautzellen) und endodermaler Zelltypen (Leberzellen, Alveolarzellen, Darmepithelien) annehmen können (vgl. Einleitung 1.3.1.). Die Analyse von MSC-Kulturen mit Hilfe sensitiver Methoden wie FACS-Analyse, Western-Blot und RT-PCR ergab, dass ein grosser Anteil nicht-induzierter MSC konstitutiv Nestin und Tuj-1 exprimieren (Tondreau et al, 2004a). Das Konzept der „Multidifferenziertheit“ MSC wird mittlerweile von vielen Arbeitsgruppen favorisiert (Tremain et al, 2001; Woodbury et al, 2002; Seshi et al, 2003; Muñoz-Elías et al, 2003;

Minguell et al, 2005; Tondreau et al, 2005; Egusa et al, 2005; Scintu et al, 2006). Die Studien machten ebenso deutlich, dass der Anteil differenzierender Zellen durch geeignete Kulturbedingungen deutlich gesteigert werden kann (Tondreau et al, 2004a; Neuhuber et al, 2004) und eine gezielte neuronale Differenzierung durch die Variation von Kulturbedingungen möglich ist. Immunhistochemisch lässt sich der Marker β -III-Tubulin in einigen Studien erst nach Induktion nachweisen (Woodbury et al, 2002; Neuhuber et al, 2004; Bossolasco et al, 2005).

Neuronale Marker sind per se nicht spezifisch

In der Mehrzahl der vorliegenden Studien wurde die neuronale Differenzierung MSC nach morphologischen und immunhistochemischen Kriterien durch den Nachweis meist weniger neuronaler Marker beurteilt, ein Umstand, der von diversen Autoren kritisch bewertet wird (Wagers & Weissman, 2004; Grove et al, 2004; Hess et al, 2004; Bertani et al, 2005; Hermann et al, 2006; Raedt et al, 2007; Phinney & Prockop, 2007). Eine geringe Anzahl von Forschungsarbeiten versuchte darüber hinaus, differenzierte Zellen durch funktionelle Untersuchungen (z. B. Nachweis von Ionenströmen und Neurotransmittern) näher zu charakterisieren (vgl. Einleitung 1.3.4 & 1.3.5.). Die Wahl eines geeigneten Markers neuronaler Differenzierung wird durch den Umstand erschwert, dass der immunhistochemische Nachweis neuronaler Antigene nicht gänzlich spezifisch ist. Man muss feststellen, dass keiner der in den Studien verwendeten Marker per se einen ausreichenden Nachweis neuronaler Differenzierung darstellt, da die jeweiligen Marker auch in anderen Geweben und Zelltypen exprimiert werden können. Diesem Aspekt wurde gerade nach den anfänglichen Berichten neuronaler Differenzierung MSC nicht genügend Beachtung geschenkt. So wird das Protein β -III-Tubulin auch in undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen (Carpenter et al, 2001) und nicht spezifisch in Tumorgewebe (Sugimoto et al, 1997; Katsetos et al, 2003; Jouhilahti et al, 2008) exprimiert. Das Intermediärfilament Nestin findet sich ebenso in regenerierenden Muskelzellen (Vaittinen et al, 2001) und endothelialen Zellen (Mokry & Nemecek, 1998; Klein et al, 2003). GFAP und Neurofilamente sind ausserdem in verschiedenen Bindegewebszellen nachweisbar (Hainfellner et al, 2001; Sainio et al, 1994).

Limitationen der Methode „Zellkultur“

Die *in-vitro*-Kultur stellt ein relativ einfaches Modell dar, die Wirkung verschiedener biologisch aktiver Substanzen auf Zellen zu untersuchen. Die grundlegenden Techniken der Zellkultur haben sich allerdings seit Jahrzehnten kaum verändert. Komplexere Prozesse wie die Differenzierung adulter Stammzellen können mit den gegenwärtigen Methoden nur bedingt simuliert werden. Die Zell-Zell-Kommunikation mit der Vermittlung parakriner Faktoren, die *in-vivo* vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Stammzelldifferenzierung spielt, ist mit den klassischen Methoden der Zellkulturtechnik schwer zu untersuchen. Es lassen sich kaum mehr als qualitative Aussagen machen. Die nach wie vor häufig applizierten Arbeitsschritte wie die Verwendung artfremden Bluterserums, die Anwendung künstlicher Substrate, der periodische Mediumersatz und das enzymatische Abheben der Zellen können die Ergebnisse verzerren. So konnte beispielsweise für die Kultur adulter neuronaler Stammzellen demonstriert werden, dass eine alternative Technik mit Accutase™ zu einem besseren Überleben der Zellen führt (Wachs et al, 2003).

Für die Interpretation der Ergebnisse unserer Versuchsanordnung ist zu berücksichtigen, dass für die Zellkultureffekte unterschiedliche Mechanismen in Frage kommen. Bei der Analyse der Effekte einzelner Faktoren auf Differenzierung der Zellen stellt sich die Frage, ob der Faktor ein induktives Differenzierungssignal ausübt oder als Überlebensfaktor einer bestimmten sich differenzierenden Zelle fungiert. Denkbar ist auch, dass durch die Kulturbedingung die Differenzierung eines Zelltyps favorisiert wird, der sekundär Überleben und Differenzierung eines anderen Zelltyps fördert. Aufgrund der niedrigen Zelldichte in unseren

Versuchen und grösstenteils abnehmender Zellzahl im Versuchsverlauf spielen letztere Mechanismen unseres Erachtens keine bedeutsame Rolle. Dass durch die Kulturbedingungen Vorläuferzellen und vordifferenzierte Zellen nicht nur selektioniert werden, sondern eine gezielte Differenzierung stattfindet, dafür sprechen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Egusa. Sie konnte in der Zellkultur muriner KM-Zellen zeigen, dass unter Induktionsbedingungen diskordante Genkluster gezielt abgeschaltet werden (Egusa et al, 2005). Wir meinen daher, dass bei unseren Kulturbedingungen von einer induktiven Wirkung der untersuchten Faktoren ausgegangen werden kann. Der Einfluss von Zell-Zell-Kontakt und parakriner Faktoren wird durch die Versuchsbedingungen bei niedriger Zelldichte weitgehend ausgeschaltet und erlaubt damit eine bessere Beurteilung der Effekte exogen zugeführter Substanzen. Das Design unserer Versuche erlaubte es allerdings nicht immer, die Effekte der Kulturbedingungen auf die einzelnen Komponenten zurückzuführen.

5.1.2. Beurteilung des *in-vitro*-Modells für neuronale Differenzierung

Die Untersuchung neuronal differenzierender Kulturbedingungen humaner MSC stellte aufgrund der oben geschilderten Sachverhalte eine Herausforderung dar, die nur schrittweise angegangen werden konnte. Für unsere Untersuchungen wurden Zellen von KM-Spendern verwendet, die aus Restmaterial der „Aktion Knochenmarkspende Bayern“ gewonnen wurden. Die Spender blieben anonym und es wurden keine klinischen Informationen weitergegeben. Mit der Verwendung adulter Stammzellen liessen sich gegenüber embryonalen Stammzellen und Stammzellen des ZNS diverse technische und ethische Probleme umgehen (vgl. Einleitung 1.2.2.).

Das neuronale Differenzierungspotential wurde durch die gezielte Variation von Kulturbedingungen wie Medium (MEM, DMEM, F12, Neurobasal™, MEM *Alpha Modification*), Serumzusatz (unterschiedliche Konzentrationsstufen), extrazellulärer Matrix (FN, LAM, PLL, PORN) sowie unterschiedlicher Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (FGF-2, NT-3, BDNF, FGF-8b, SHH) untersucht. Für die Versuche wurde eine unter identischen Isolierungs- und Kulturbedingungen gewonnene Ausgangspopulation verwendet. Eine definierte Kulturbedingung mit FGF-2 als Standardwachstumsfaktor diente als interner Vergleichsmaßstab. Für FGF-2 konnte gezeigt werden, dass sich mit dem Mitogen neuronale Vorläuferzellen aus embryonalen (Okabe et al, 1996) und neuronalen Stammzellen (Richards et al, 1992; Kilpatrick & Bartlett, 1995; Gritti et al, 1996; Kuhn et al, 1997; Tropepe et al, 1999) anreichern lassen. Die Experimente wurden zusätzlich durch eine Versuchsbedingung mit nicht-induzierten Zellen, die in Standardmedium und ohne Wachstumsfaktor kultiviert wurden, intern validiert. Während des laufenden Versuchs wurden die einzelnen Versuchskammern lichtmikroskopisch beurteilt. Beobachtet und bewertet wurden jeweils Proliferation und morphologische Veränderung. Nach sechs Kulturtagen wurde der Versuch beendet.

Als Marker neuronaler Differenzierung wurde die Expression des frühen neuronalen Proteins β -III-Tubulin gewählt. Der Nachweis des Proteins ist mit neuronal vordifferenzierten und frühen Neuronen assoziiert (Caccamo et al, 1989a & b) und wurde daher als „neuron-spezifischer“ Marker bezeichnet (Lee et al, 1990). Das neuronale Protein ist Bestandteil des Mikrotubuli-Systems der Nervenzelle. Die Phosphorylierung des β -III-Tubulins resultiert in einer Stabilisierung der Mikrotubuli, Grundvoraussetzung für die Neuritenextension in differenzierenden Neuronen (Ferreira & Caceres, 1992; Laferrière et al, 1997). Der verwendete Marker bindet sowohl an die phosphorylierte wie unphosphorylierte Form des polymerisierten Proteins (Fanarraga et al, 1999). Ein ebenso häufig verwendeter Marker ist Nestinfilament, dessen Nachweis für unreife neuroepitheliale Vorläuferzellen typisch ist (Lendahl et al., 1990). Dessen Expression wird im Laufe der neuronalen Differenzierung durch zelltypspezifische Marker wie dem sauren Gliafaserprotein (GFAP) oder Neurofilamenten abgelöst, wie aus Untersuchungen an neuronalen Stammzellen des embryonalen und

adulten Säugerhirns bekannt ist (Reynolds et al, 1992; Gritti et al., 1996; Weiss et al, 1996; Tropepe et al, 1999). Allerdings wird die Expression von Nestin stark durch die Serumkonzentration der Kulturbedingung beeinflusst (Joannides et al, 2004; Wislet-Gendebien et al, 2005) und war daher für unsere Zwecke kein geeigneter Marker. Die Expression von β -III-Tubulin scheint im Gegensatz dazu wenig von der Anwesenheit von Serum beeinflusst zu sein (Croft & Przyborski, 2004). Mit dem Nachweis des Neurofilaments kann man daher davon ausgehen, dass sich die markierten Zellen im Entwicklungsstadium vordifferenzierter und früher Neurone befinden. In einigen Vorversuchen wurde auch überprüft, ob sich bei induzierten Zellen GFAP nachweisen lässt, das typischerweise von Astrozyten exprimiert wird. Dabei fanden sich nur wenige Zellen mit glialer Markerexpression. Wir mussten daher annehmen, dass die getesteten Kulturbedingungen nicht primär die gliale Differenzierung förderten. Die Ergebnisse unserer Vorversuche decken sich mit den publizierten Befunden zahlreicher anderer Arbeitsgruppen. Die Mehrzahl der Studien dokumentiert keine signifikante gliale Differenzierung für die verwendeten Induktionsprotokolle (Woodbury et al, 2002; Kim et al, 2002; Rismanchi et al, 2003; Croft & Przyborski, 2004; Abouelfetouh et al, 2004; Dezawa et al, 2004; Cho et al, 2005; Tao et al, 2005; Tropel et al, 2006; Pacary et al, 2006; Rivera et al, 2006; Raedt et al, 2007; Shiota et al, 2007). Einige Arbeitsgruppen fanden erst nach langer Kulturdauer (Joannides et al, 2003; Jiang et al, 2003; Wislet-Gendebien et al, 2005) oder in serumfreien Kulturen zu einem geringen Anteil GFAP-positive Zellen (Padovan et al, 2003). Die Untersuchungen von Bossolasco und Kollegen weisen darauf hin, dass die gliale Differenzierung komplexere Kulturbedingungen mit humoralen Faktoren einer Astrozytenkokultur und glialen Zellen als Hilfszellen benötigt (Bossolasco et al, 2005).

Es wurde bereits diskutiert, dass keiner der häufig verwendeten Marker per se ein ausreichender Nachweis neuronaler Differenzierung darstellt. Die Zusammenschau von Morphologie und dem Resultat der immunocytochemischen Färbung ist daher ein wichtiges Korrektiv. Zwischen morphologischen und immunocytochemischen Befunden gab es in unseren Versuchsreihen keine Widersprüche. Die markierten Zellen wiesen eine meist bipolare Morphologie auf. Wir versuchten in Vorversuchen durch unterschiedliche Massnahmen die Validität der immunhistochemischen Färbung zu gewährleisten. Zunächst wurden adäquate Antikörperkonzentrationen evaluiert. Durch die Inkubation der Präparate mit Ziegenerum wurde die Möglichkeit unspezifischer Bindungen der Antikörper und Färbefaktoren vermindert. Um die Möglichkeit einer nichtspezifischen Bindung des Sekundär-Antikörpers auszuschliessen, wurden Färbungen einiger Zellkulturen ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Schliesslich wurde der Nachweis des neuronalen Proteins an einer immortalisierten Linie neuraler Stammzellen (C17.2) getestet.

Im Laufe unserer Untersuchungen waren wir in jeder Versuchsreihe mit Zellpopulationen konfrontiert, die ohne neuronale Induktion zu einem geringen Anteil das neuronale Protein β -III-Tubulin exprimierten. Dieser Befund überrascht nicht, wenn angenommen wird, dass MSC multidifferenziert sind (s.o.). Es ist ebenso denkbar, dass einige Zellen durch die Expansionskultur schon determiniert waren und durch die Anwesenheit von Serumfaktoren dem neuronalen Differenzierungsweg folgten. Der Einsatz von Seren unterschiedlicher Chargen im Vorfeld unserer Versuchsreihen konnte das Problem nicht beheben. Eine alternative Erklärung dieser spontanen Differenzierung ist die Kontamination der Zellkultur durch Zelltypen, die sich unspezifisch anfärben liessen. So können nach Angaben der Arbeitsgruppe Tondreau auch mononukleäre Zellen β -III-Tubulin exprimieren (Tondreau et al, 2004a).

In den Kulturen mit hoher Zelldichte konnten wir eine Abnahme positiv markierter Zellen feststellen. Wir vermuten daher, dass der Zell-Zell-Kontakt während der initialen Determination für den neuronalen Differenzierungsweg einen inhibierenden Effekt ausübt. Hinweise dafür kommen aus früheren Untersuchungen an murinen neuralen Stammzellen (Richards et al, 1992). Die Effekte der Versuchsbedingungen hinsichtlich neuronaler

Differenzierung und Proliferation wurde am Ende des Versuchs quantifiziert. Aufgrund der meist niedrigen Zellzahl war allerdings nur eine immuncytochemische Auswertung möglich. Dieses Problem bei Differenzierungsstudien wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Bossolasco et al, 2005). Eine nähere Charakterisierung der Zellen durch andere Methoden wäre wünschenswert gewesen, allerdings waren wir durch die beschränkte Verfügbarkeit von Ausgangsmaterial limitiert. Parallel zur Differenzierung wurde die Auswirkung der getesteten Substanzen auf die Zellproliferation durch die Ermittlung eines einfachen Proliferations-Index am Ende des Versuchs analysiert.

Da die Anwesenheit von Serum aufgrund seiner undefinierten Zusammensetzung die vollständige Standardisierung der Kulturbedingungen für die Zellen verhindert, wurde angestrebt, auf Serum als Bestandteil des Kulturmediums zu verzichten. Kulturen unter serumfreien Bedingungen waren allerdings in unseren Versuchsreihen durch hohen Zellverlust gekennzeichnet. Der Versuch, chemisch voll definierte Kulturbedingungen für die neuronale Differenzierung humaner MSC zu etablieren, muss als nicht gelungen betrachtet werden. Die Ergebnisse der serumfreien Kulturbedingungen sind daher mit Zurückhaltung zu interpretieren. Der experimentelle Ansatz mit serumreduzierten Versuchsbedingungen war hingegen erfolgreich und erlaubte es, den Einfluss nicht definierter Serumfaktoren entsprechend zu reduzieren.

Eine vollständige terminale Differenzierung konnte bei einer Kulturdauer von sechs Tagen nicht erreicht werden, was neben dem Zeitfaktor wohl auch dem Fehlen wichtiger Faktoren für die terminale Differenzierung zuzuschreiben ist. Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die neuronale Reifung vordifferenzierter MSC ähnlich wie bei embryonalen und neuralen Stammzellen (Wagner et al, 1999b; Song et al, 2002; Panchision & McKay, 2002) eine komplexe Kokultur (Sanchez-Ramos et al, 2000; Jiang et al, 2003; Joannides et al, 2003; Abouelfetouh et al, 2004; Bossolasco et al, 2005; Wislet-Gendebien et al, 2005) sowie grösstenteils noch nicht definierte humorale und zellgebundene Faktoren glialer Zellen (Joannides et al, 2003; Bossolasco et al, 2005; Rivera et al, 2006) erfordert. Im Gegensatz dazu berichtet die Arbeitsgruppe von D'Ippolito und Kollegen für die von ihnen identifizierten MIAMI-Zellen, dass sie ohne jegliche Kokultur zu nahezu ausdifferenzierten Nervenzellen (D'Ippolito et al, 2004) und dopaminergen Neuronen (Tatard et al, 2007) reifen können.

Wir beschränkten uns in unseren Untersuchungen bewusst auf eine kurze Kulturdauer. Es wurden daher vor allem jene Faktoren untersucht, die für die initiale Determinierung humaner MSC für den neuronalen Differenzierungsweg verantwortlich sind. Mit der immuncytochemischen Auswertung und der Ermittlung des Proliferations-Index wurde eine einfache Screening-Strategie gewählt. Dieses Vorgehen erlaubte eine rasche Beurteilung einer Vielzahl an Kulturbedingungen hinsichtlich der Variablen Differenzierung und Proliferation, beschränkt allerdings die Aussagekraft der Ergebnisse. Die weitere Klärung spezifischer Fragestellungen und die Bestätigung der Ergebnisse würde ein breites Spektrum an immunologischen, molekularbiologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen erfordern. Die Konfrontation mit anderen Studienergebnissen ist hilfreich, um die Ergebnisse besser bewerten und in den gegenwärtigen Wissensstand einordnen zu können. Dies soll bei der Diskussion der einzelnen Versuchsreihen geschehen.

Selbstverständlich spiegelt die *in-vitro*-Kulturbedingung die Situation *in-vivo* nur begrenzt wieder. Es ist daher in geeigneten *in-vivo*-Modellen zu überprüfen, inwieweit transplantierte Vorläuferzellen bei entsprechendem permissivem Milieu die *in-vitro* gezeigte Plastizität auch *in-vivo* demonstrieren.

5.1.3. Beurteilung der statistischen Methodik

Von den gängigen statistischen Verfahren bot die Analyse der Daten mit der multivariaten Varianzanalyse die einzige Möglichkeit, den Einfluss auf Proliferation und Differenzierung direkt zu quantifizieren. Für einen paarweisen Vergleich wäre es nur legitim gewesen, Zellen gleicher Zell-Linien zu vergleichen. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wurde aber in jedem Experiment jede Zell-Linie nur einmal eingesetzt. Das Design der Experimente ist zudem nicht vollständig balanciert. Aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten konnten nicht alle Faktorvariationen konsequent getestet werden. Es ist daher nicht immer möglich, die Effekte einer Kulturbedingung auf einen einzelnen Faktor zurückzuführen. Die Ergebnisse sind dann als durchschnittlicher Effekt der Kulturbedingung zu betrachten. Aussagen zu Wechselwirkungen einzelner Faktoren untereinander sind aufgrund des Versuchsaufbaus kaum möglich. Von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurden Experimente mit deutlich positiver Negativkontrolle (β -III-Tubulin > 7%). Damit sollte gewährleistet werden, dass nur diejenigen Experimente der Datenanalyse zugeführt werden, von denen wir annehmen konnten, dass die untersuchten Zellen für die jeweiligen Kulturbedingungen reagibel und nicht bereits vordifferenziert waren. Bei der Auswertung wurden p-Werte, die kleiner als 0.05 sind als auffällig und gegenüber der Bezugsstufe als signifikant interpretiert.

In den vorgeschalteten globalen Tests zeigte sich, dass sich die einzelnen Zell-Linien der verschiedenen Spender signifikant in ihrer Antwort auf die untersuchten Einflussfaktoren unterscheiden. Dieser Umstand musste in der statistischen Analyse und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Auswertung des Datensatzes ergab, dass die Variable B3Null am wenigsten deutlich bis überhaupt nicht von den experimentellen Bedingungen beeinflusst wird. Zellen die in unseren Versuchen nur schwach positiv für das neuronale Antigen waren, zeigten sich also den Versuchsbedingungen gegenüber kaum reagibel und wurden daher nicht gewertet. Die Bedeutung und Natur dieser intermediären Zellpopulation ist unklar und wurde nicht weiter untersucht.

In der Auswertung der Einzelexperimente (statistisches Modell 1) wurde der gesamte Versuchsaufbau abgebildet und der komplette Datensatz analysiert. Da der Versuchsaufbau insgesamt abgebildet wird, ist das Modell besonders geeignet, die Korrelation zwischen Differenzierung und Proliferation sowie Unterschiede zwischen den Zell-Linien zu analysieren. Die übrigen Modelle bilden nicht den Versuchsaufbau ab. Sie dienen der quantitativen Bewertung der Effekte einzelner Substanzen. Bezugsstufe ist die Nicht-Anwesenheit des Faktors. Die Parameter-Schätzer geben den durchschnittlichen Effekt einer jeden Substanz gegenüber dessen Nicht-Anwesenheit an.

Für die deskriptive Darstellung der Ergebnisse wurden Balkengraphiken gewählt; die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angezeigt. Es gilt zu beachten, dass die Mittelwerte und Parameter-Schätzer (B-Wert) im Zahlenwert voneinander abweichen. B-Werte können als "adjustierte, mittlere Differenz" verstanden werden.

Die Anpassungsgüte der statistischen Modelle wurde mit dem Bestimmtheitsmaß (*adjusted R squared*) und Residuenplots geprüft. Das Bestimmtheitsmaß lag zwischen 50% und 70%, was bei der Varianzanalyse medizinisch-biologischer Daten für eine gute Modell-Anpassung spricht. Die Residuenplots gaben keine Hinweise auf Modellierungs-Probleme. Alternative Auswertungen mit modifizierten Modellen und veränderter Auswahl von Datensätzen, auch mit ln-transformierten Daten, brachten vergleichbare Ergebnisse. Die Ergebnisse (Parameter-Schätzer, p-Werte) waren ausreichend robust bezüglich der Modell-Wahl und es fanden sich keine sachlogischen Widersprüche. Insgesamt konnten Brauchbarkeit und Gültigkeit der gewählten Modelle bestätigt werden.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Es ist bekannt, dass Zustand und Funktion von Stammzellen weitgehend von ihrer direkten Mikroumgebung bestimmt werden (Watt & Hogan, 2000). Ebenso ist der Übergang von undifferenzierten, teilungsfähigen Vorläuferzellen in differenzierte postmitotische Zellen in hohem Masse durch extrazelluläre Signale beeinflusst (Vicario-Abejón et al, 1995; McKay et al, 1997). Die exakte Mikroumgebung bestimmter Stammzellen und Vorläuferzellen exakt *in-vitro* zu kontrollieren, stellt eine besondere Herausforderung dar. Wenig ist bislang bekannt hinsichtlich Faktoren und Komponenten des lokalen Mikromilieus, welche Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen des stromalen Zellkompartiments regeln (Minguell et al, 2001; Chen et al, 2007a). In unserer Arbeit versuchten wir Einflussfaktoren von Proliferation und neuronaler Differenzierung humaner MSC durch die Variation unterschiedlicher Komponenten der Zellkultur systematisch zu untersuchen. Dem Umstand, dass **zwischen Zellproliferation und –differenzierung ein reziproker Zusammenhang** besteht (vgl. Ergebnisse 4.3.), soll in der Diskussion der Ergebnisse Rechnung getragen werden. Der Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf Wachstum und neuronale Differenzierung wird daher in gemeinsamen Abschnitten diskutiert.

5.2.1. Einfluss des Mediums und der Zellkulturzusätze B27 und N2

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Zellkulturmedien und zweier Supplemente auf Proliferation und neuronale Differenzierung MSC untersucht. Die Medien MEM, MEM *Alpha Modification*, DMEM und F12 sowie Neurobasal™ sind Basalmedien, die die grundlegenden Nährstoffe für das Wachstum unterschiedlicher Zelltypen bereitstellen. Sie enthalten Aminosäuren, Vitamine und anorganische Salze in unterschiedlicher Zusammensetzung. Ihnen fehlen allerdings zusätzliche, für das Wachstum spezifischer Zelltypen notwendige Faktoren. Basalmedien werden daher je nach Bedarf mit Serum und anderen Zellkulturzusätzen supplementiert. Unter den Basalmedien kann F12 als nährstoffreiches Medium betrachtet werden, denn es enthält gegenüber den einfacheren Formulierungen von MEM und DMEM alle kanonischen Aminosäuren und zusätzliche Komponenten, darunter einen höheren Glukoseanteil und verschiedene Antioxidantien. Das Medium Neurobasal™ ist ein modifiziertes DMEM-Medium und wurde ursprünglich für die Kultivierung embryonaler hippocampaler Neurone (Brewer & Cotman, 1989; Brewer et al, 1993) designt. Es genügt daher in besonderer Weise den Anforderungen neuronaler Zellkulturen. Die nährstoffreichen Medien F12 und Neurobasal™ finden häufig Verwendung in der Kultivierung unterschiedlicher zentralnervöser Neuronenpopulationen, die Kombination mit den in unserer Versuchsreihe ebenso getesteten Supplementen B27 und N2 erlaubt die Kultivierung in serumfreien Bedingungen (Brewer et al, 1993; Brewer, 1995). Für die Expansion adulter neuronaler Stammzellen erwies sich das Medium Neurobasal™ zusammen mit dem Supplement B27 als besonders effektiv (Wachs et al, 2003). Gegenüber dem Supplement N2 ist B27 reicher an Zusatzstoffen und enthält zusätzliche Antioxidantien und Vitamin-A-Säure. Vergleichende Studien, die den Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf Proliferation und neuronale Differenzierung MSC systematisch untersuchen, gibt es bislang nicht. Die Analyse der Daten anhand der unterschiedlichen Modelle ergab den Befund, dass sich die nährstoffreicheren Medien F12 und Neurobasal™ sowie die Supplemente B27 und N2 günstig auf die neuronale Differenzierung der Zellen auswirken und weniger stark die Proliferation fördern. Die gesonderte Analyse der Effekte der Zellzusätze B27 und N2 (statistisches Modell 7) ergab keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Supplementen. Eine prospektive Planung entsprechender Experimente, die die isolierte Betrachtung der einzelnen Faktoren erlaubt, könnte weiter Aufschluss geben. Die Auswertung der Ergebnisse anhand der unterschiedlichen statistischen Modelle lässt aber den vorläufigen Schluss zu, dass insbesondere die in den komplexeren Medien und Supplementen enthaltenen

Antioxidantien für den positiven Einfluss auf die neuronale Differenzierung verantwortlich sind. Ein Benefit antioxidativer Substanzen könnte darauf hinweisen, dass sich ein hoher O₂-Gehalt ungünstig auf die Differenzierung der Zellen auswirkt. Diese Überlegung stützt sich auf unterschiedliche Studien, die einen positiven Einfluss von Hypoxiebedingungen auf Proliferation, Überleben und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen sowie MSC zeigen konnten (Brewer & Cotman, 1989; Studer et al, 2000; D'Ippolito et al, 2006b; Pacary et al, 2006).

5.2.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren und von Heparin

Von den vielen in die Neurogenese involvierten Faktoren wurden insgesamt fünf Wachstumsfaktoren (FGF-2, NT-3, BDNF, FGF-8b, SHH) in den verschiedenen Versuchsreihen untersucht. Zahlreiche Studien belegen für die untersuchten Faktoren den Einfluss auf neurale Vorläuferzellen und die Bedeutung bei der Determination neurogener Zellschicksale. Der von uns als Standardwachstumsfaktor verwendete FGF-2 ist ein wichtiger Repräsentant aus der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren. Fibroblastenwachstumsfaktoren agieren häufig als mitogene Faktoren, vermitteln aber ebenso Zellüberleben und Differenzierung (Yamaguchi & Rossant, 1995; Bikfalvi et al, 1997; Ornitz & Itoh, 2001; Dono, 2003; Yeoh & de Haan, 2007). Es wird postuliert, dass FGF-2 unter anderem von humanen Stromazellen produziert wird und die extrazelluläre Matrix des KM als funktionelles Reservoir für den Wachstumsfaktor fungiert (Brunner et al, 1991 & 1993). Der Fibroblastenwachstumsfaktor findet neben EGF Verwendung zur Isolierung und Kultivierung adulter neuronaler Stammzellen der Subventrikularzone (Morshead et al, 1994; Weiss et al, 1996; Gritti et al, 1995, 1996 & 1999), des Rückenmarks (Weiss et al, 1996; Shihabuddin et al, 1997), des adulten Striatums (Gritti et al, 1995) und des Hippocampus (Gage et al, 1995; Palmer et al, 1999). Mit Hilfe beider Wachstumsfaktoren lassen sich neurale Stammzellen über mehrere Passagen vermehren (Richards et al, 1992; Reynolds et al, 1992; Reynolds & Weiss, 1992; Vescovi et al, 1993; Kilpatrick & Bartlett, 1993 & 1995; Morshead et al, 1994; Tropepe et al, 1999; Ciccolini et al, 1998; Maric et al, 2003) und können als sogenannte Neurosphären (Gritti et al, 1996 & 1999; Reynolds & Weiss, 1992; Reynolds et al, 1992) oder als adhärenzte Kulturen (Johe et al, 1996; Ray et al, 1993) kultiviert werden. Für die Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen sind gewöhnlich andere Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen vonnöten, hinsichtlich Überleben und Differenzierungskapazität muriner (Lee et al, 2000) und insbesondere humaner embryonaler Stammzellen zeigten sich hingegen auch für FGF-2 klare Effekte (Amit et al, 2000; Schuldiner et al, 2000; Xu et al, 2005a & 2005b; Wang et al, 2005b; Levenstein et al, 2006). Interessanterweise haben Untersuchungen an neuronalen Stammzellen (Galli et al, 2000) und MSC (Kuznetsov et al, 1997) erhebliche Speziesunterschiede offenbart. In zahlreichen *in-vitro*-Untersuchungen unterschiedlicher Forschergruppen an mesencephalen (Bouvier & Mytilineou, 1995; Ferrari et al, 1989; Mayer et al, 1993) und hippocampalen Nervenzellen (Walicke et al, 1986; Deloulme et al, 1991; Ferrari et al, 1991, Ray et al, 1993; Vicario-Abejón et al, 1995) sowie neuroepithelialen Vorläuferzellen unterschiedlicher Gehirnregionen (Gensburger et al, 1987; Murphy et al, 1990; Kilpatrick & Bartlett, 1993; Ciccolini & Svendsen, 1998; Whittemore et al, 1999; Hajihosseini & Dickson, 1999; Lillien & Raphael, 2000; Ciccolini, 2001) wurde für FGF-2 die Vermittlung von Zellüberleben, Proliferation und neuronaler Differenzierung dokumentiert. Die Arbeitsgruppe um F. H. Gage hat durch ihre Untersuchungen an adulten neuronalen Stammzellen der Ratte neben der mitogenen Funktion von FGF-2 insbesondere die Bedeutung höhere FGF-2-Konzentrationen für die neuronale Differenzierung gezeigt (Palmer et al, 1995 & 1999). Die Bedeutung des Fibroblastenwachstumsfaktors für die Neurogenese wurde ebenso *in-vivo* vielfach nachgewiesen (Powell et al, 1991; Craig et al, 1996; Kuhn et al, 1997; Dono et al, 1998; Wagner et al, 1999a; Vaccarino et al, 1999; Raballo et al, 2000; Cheng et al, 2002; Jin

et al, 2003b; Jukkola et al, 2006). Die von Studer und anderen Forschergruppen beobachteten Effekte von FGF-2 auf mesencephale Vorläuferzellen dopaminerg Neurone (Studer et al, 1998) konnten auch an menschlichen zentralnervösen neuronalen Vorläuferzellen nachvollzogen werden (Sánchez-Pernaute et al, 2001). Aufgrund seiner zahlreichen Eigenschaften findet der Fibroblastenwachstumsfaktor daher häufig Verwendung in Zellkulturen zur Vermehrung inhärenter Vorläuferzellen und zur Induktion neuronaler Differenzierung. Die Effekte von FGF-2 auf MSC unterschiedlicher Spezies stellen sich uneinheitlich dar. Verschiedene Forschergruppen berichteten, dass die Zellpopulation durch die Zugabe von FGF-2 effektiver über mehrere Passagen hinweg expandiert werden können, ohne dabei ihr Differenzierungspotential zu verlieren (Oliver et al, 1990; Tsutsumi et al, 2001; Bianchi et al, 2003). Mitogene und induzierende Effekte von FGF-2 sind möglicherweise von Konzentration und Verabreichungsmodus abhängig. Hinweise darauf liefert die Studie von Hori und seiner Arbeitsgruppe. Sie untersuchten den Effekt unterschiedlicher Kultursubstrate und des Fibroblastenwachstumsfaktors auf Proliferation und osteogene Differenzierung mesenchymaler Rattenstromazellen. Niedrige Dosierungen des Wachstumsfaktors förderten dabei eher die Differenzierung der KM-Zellen, während hochdosierte Gaben von Wachstumsfaktor die Proliferation begünstigten (Hori et al, 2004). Gronthos und Simmons etablierten unter Verwendung der Stro-1-positiven Zellfraktion humaner KM-Zellen ein serumfreies Kultursystem und untersuchten anschliessend einzeln 25 Zytokine und Wachstumsfaktoren hinsichtlich ihres proliferativen Effekts auf inhärente klonogene Vorläuferzellen. Als Surrogat für den proliferativen Effekt der untersuchten Faktoren beurteilten sie ihre Effizienz, die Anzahl der fibroblasten-ähnlichen Einzelzellkolonien in Kultur zu steigern. Dabei stimulierten PDGF und EGF am effektivsten die Entstehung der Zellkolonien. Für FGF-2 hingegen konnte in dem von den Forschern verwendeten Kultursystem weder allein noch in Anwesenheit von Heparin ein Effekt auf das Wachstum koloniebildender Zellen nachgewiesen werden (Gronthos & Simmons, 1995). Die von Gronthos und Simmons präsentierten Ergebnisse konnten in Folgeuntersuchungen nicht reproduziert werden. Kuznetsov und Kollegen untersuchten die proliferativen Effekte unterschiedlicher Wachstumsfaktoren an unselektionierten murinen und humanen MSC unter Verwendung eines experimentellen Ansatzes mit konditioniertem Medium (Kuznetsov et al, 1997). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Gronthos und Simmons gelang es dem Forscherteam nicht, die Effekte des konditionierten Mediums durch eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren in serumfreier Kulturbedingung zu ersetzen. Die Autoren schliessen aus ihren Ergebnissen, dass die koloniebildenden Zellen der stromalen KM-Fraktion auf von KM-Zellen produzierte und in konditioniertem Medium anwesende Faktoren angewiesen sind. Um die stimulierenden Faktoren näher zu bestimmen, verwendeten die Forscher neutralisierende Antikörper gegen vier unterschiedliche Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, TGF- β , bFGF). Dabei unterdrückten alle vier Antikörper in unterschiedlichem Ausmass die Entstehung adhärenter Zellkolonien. In humanen Zellkulturen war die Inhibition durch anti-PDGF und anti-TGF- β am deutlichsten ausgeprägt, Antikörper gegen die beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF beeinträchtigten die Proliferation weniger stark. In ihren Untersuchungen mit unfractioniertem KM der Maus konnten Wang und Kollegen für bFGF lediglich in Kombination mit einem hohen Serumanteil einen proliferativen Effekt auf koloniebildende Einheiten nachweisen (Wang et al, 1990).

Die in unseren Versuchsreihen neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH spielen eine wesentliche Rolle bei der Induktion dopaminerg und serotonerg Neurone in der ventralen Mittel- und Hinterhirnregion (Wang et al, 1995; Bikfalvi et al, 1997; Ye et al, 1998; Perrone-Capano & Di Porzio, 2000), ein Effekt, der auch *in-vitro* reproduzierbar ist (Hynes et al, 1995; Eriscon et al, 1995; Stull & Iacovitti, 2001). Durch die Zugabe von FGF-8b und SHH in einem sequentiellen Protokoll differenzieren embryonale Mausstammzellen (Lee et al, 2000), eine murine neurale Stammzell-Linie (Kim et al, 2003) sowie humane

MIAMI-KM-Zellen (Tatard et al, 2007) entlang eines dopaminergen Differenzierungswegs. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Kokultur embryonaler Stammzellen der Maus mit einer KM-Stromazell-Linie erzielt, wenngleich die für den induktiven Effekt verantwortlichen Faktoren in diesem Modell nicht bekannt sind (Kawasaki et al. 2000).

Die in unserer letzten Versuchsreihe verwendeten Faktoren NT-3 und BDNF sind strukturell verwandte Proteine und gehören zur Gruppe der Neurotrophine. Beide Proteine agieren als regulierende und differenzierende Faktoren peripherer und zentraler Neuronenpopulationen des embryonalen und adulten Nervensystems (Maisonpierre et al, 1990; Fariñas et al, 1994; Davies, 1994; Maness et al, 1994; Holtzman & Mobley, 1994; Snider, 1994; Ghosh & Greenberg, 1995; Ockel et al, 1996a & 1996b; Lewin & Barde, 1996; Bonhoeffer, 1996). Sie sind ferner beteiligt an Apoptosevorgängen (Bunone et al, 1997) und Prozessen der synaptischen Plastizität (Kang und Schuman, 1995 & 1996; Vicario-Abejón et al, 2002; Marty et al, 2000; Kojima et al, 2002). In der *in-vitro*-Kultur sympathischer und sensorischer Neurone sowie zentraler Nervenzellen fördern die beiden Wachstumsfaktoren das Überleben (Birren et al, 1993; Dechant et al, 1993; DiCicco-Bloom et al, 1993; Lindholm et al, 1996) und das Aussprossen von Neuriten (Lindsay et al, 1985; Davies et al, 1986; Avila et al, 1993; McAllister et al, 1997). Die Ergebnisse einer Reihe von *in-vitro*-Untersuchungen an cholinergen Neuronen des Rückenmarks (Kato & Lindsay, 1994), des basalen Vorderhirns (Ahmed et al, 1995; Hashimoto et al, 1999; Barnabé-Heider & Miller, 2003; Pappas & Parnavelas, 1997; Arsenijevic & Weiss, 1998), des Kleinhirns (Lärkfors et al, 1996) sowie des Hippokampus (Ip et al, 1993; Shetty & Turner, 1998) und des Striatums (Ventimiglia et al, 1995) belegen den Einfluss der beiden Neurotrophine insbesondere in frühen Entwicklungsphasen. In Untersuchungen an EGF-generierten neuronalen Stammzellen der Maus (Ahmed et al, 1995; Arsenijevic & Weiss, 1998) sowie hippokampalen Stammzellen der Ratte (Shetty & Turner, 1998) liessen sich für den Wachstumsfaktor BDNF Effekte sowohl auf Überleben als auch auf neuronale Differenzierung der Zellen nachweisen. Unklar ist die Bedeutung der beiden Neurotrophine für die Vermittlung proliferativer Effekte. Nach Untersuchungen von Vicario-Abejón stimulieren sie die neuronale Reifung, haben aber selbst keinen Einfluss auf die Zellteilungsrate (Vicario-Abejón et al, 1995, 1998 & 2002).

Mit der Auswertung der Daten anhand der unterschiedlichen statistischen Modelle konnte für alle untersuchten Wachstumsfaktoren ein Effekt auf die neuronale Determinierung humaner MSC nachgewiesen werden. Als Einzelfaktor hatte der von uns als Standardwachstumsfaktor verwendete FGF-2 den grössten Effekt. Im direkten Vergleich der Experimente der zweiten Versuchsreihe (statistisches Modell 1) zeigten die neu eingeführten Wachstumsfaktoren einzeln keine Überlegenheit gegenüber FGF-2, mit der Kombination der Faktoren resultierte aber ein deutlich positiver Einfluss auf die neuronale Differenzierung, der bei der *minimal-serum-condition* noch zusätzlich gesteigert werden konnte. Die Kombination der beiden Faktoren FGF-8b und SHH erscheint daher besonders aussichtsreich im Hinblick auf die neuronale Determinierung MSC. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung der fünften Versuchsreihe: hier zeigten die beiden Neurotrophine BDNF und NT-3 keine Überlegenheit gegenüber FGF-2 oder der Kombination von FGF-8b und SHH. Wurden aber die beiden Neurotrophine mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 kombiniert, konnte ein additiver Effekt erzielt werden. Prinzipiell war das Design unserer Experimente nicht darauf ausgerichtet, Wechselwirkungen der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren untereinander näher zu untersuchen. Die Beobachtung kann aber als Hinweis darauf gelten, dass sich die neuronale Determinierung und Reifung MSC mit der Verwendung eines einzelnen globalen Wachstumsfaktors nicht erzielen lässt, sondern Effekt einer Kombination unterschiedlicher Faktoren ist. Es muss wohl davon ausgegangen werden, dass analog zur Anzucht und neuronalen Induktion embryonaler und neuraler Stammzellen die neuronale Differenzierung MSC mehrere Stadien umfasst, die jeweils durch mitogene Faktoren und spezifische Signalmoleküle gekennzeichnet sind. Hinweise darauf liefern die Untersu-

chungen von Jiang und seiner Forschungsgruppe, die mit bFGF als Einzelfaktor keine Differenzierung zu einem reiferen neuronalem Phänotyp erreichen konnten (Jiang et al, 2003). Die induzierenden Effekte der Wachstumsfaktoren standen in unseren Versuchsreihen klar im Vordergrund. Eindeutig positive Effekte einzelner Faktoren hinsichtlich Proliferation humaner MSC konnten nicht nachgewiesen werden. In den statistischen Modellen, die die mittleren Effekte der einzelnen Faktoren bewerten, zeigte sich für die neu eingeführten Wachstumsfaktoren SHH und FGF-8b gegenüber deren Nicht-Anwesenheit eine auffällige Inhibierung des Zellwachstums. Die Anwesenheit von FGF-2 übte nach den unterschiedlichen Analysen eher einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen aus (statistische Modelle 3, 5 & 8). In den einzelnen Versuchsreihen hatten insbesondere die Kulturbedingungen mit *minimal-serum-condition* einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Wang und Kollegen (Wang et al, 1990) konnten wir selbst bei hohem Serumanteil keinen positiven Einfluss des Fibroblastenwachstumsfaktors hinsichtlich Zellproliferation feststellen. Allerdings war das experimentelle Design wenig geeignet, um mögliche proliferative Effekte einzelner Wachstumsfaktoren nachzuweisen. Zum einen wurden die Effekte der untersuchten Wachstumsfaktoren in unseren Versuchsreihen von der Anwesenheit unterschiedlicher Serumkonzentrationen überlagert. Für die Versuchsbedingungen, die mehrere Faktoren miteinander kombinieren, kann andererseits nicht ausgeschlossen werden, dass proliferative Effekt einzelner Faktoren durch Zugabe stark differenzierender Faktoren antagonisiert werden.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss von Heparin in der Differenzierungskultur untersucht und in einem geeigneten statistischen Modell ausgewertet (statistisches Modell 5). Für die Expansion und Differenzierungskultur MSC (Oliver et al, 1990; Brunner et al, 1991; Emami et al, 1997) sowie zentraler neuronaler Vorläuferzellen und Nervenzellen (Walicke et al, 1986; Whittemore et al, 1999) wurden Heparansulfat zusätzliche stimulatorische Eigenschaften zugesprochen. Die Zugabe exogenen Heparins in unsere Kulturbedingungen zeigte aber keinen zusätzlichen Effekt hinsichtlich neuronale Differenzierung und Proliferation. Es ist allerdings nicht auszuschliessen, dass der Einfluss des exogen zugeführten Faktors durch die Anwesenheit endogenen gebundenen Heparansulfats und die Anwesenheit des Serums maskiert wurde. Ebenso ist denkbar, dass die induktiven Effekte des Wachstumsfaktors FGF-2 in unseren Kulturbedingungen auf Heparin-unabhängige Weise (Roghani et al, 1994) vermittelt wurden.

5.2.3. Einfluss des Serumanteils

Serum enthält wichtige regulatorische Faktoren für Adhäsion, Proliferation und Funktion der Zellen. Insbesondere preisgünstiges und in grossen Mengen verfügbares fetales Kälberserum findet daher in Zellkulturen häufig Verwendung. Für die proliferativen Effekte von Serum werden hauptsächlich darin enthaltene Wachstumsfaktoren wie PDGB-BB, EGF, FGF-2 und TGF- β 2 (Walthall & Ham, 1981; Wang et al, 1990; Gronthos & Simmons et al, 1995; Kuznetsov et al, 1997; Müller et al, 2006; Ng et al, 2008) verantwortlich gemacht. Serumfaktoren garantieren auch eine ungestörte Expansion und Differenzierung MSC. Aus unterschiedlichen Gründen ist man allerdings bemüht, auf Serum, insbesondere tierischen Ursprungs, als Bestandteil von Kulturmedien zu verzichten. In neuronalen Zellkulturen etwa fördern die in unfraktioniertem Serum enthaltenen Faktoren die Proliferation von Glia und Fibroblasten (Kaufman & Barrett, 1983). Die undefinierte Zusammensetzung von Serum verhindert ausserdem die vollständige Standardisierung der Kulturbedingungen. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist der Umstand, dass die Zusammensetzung des tierischen Serums von Lot zu Lot variabel ist. Während Protokolle für die Anzucht neuronaler Zellen aus neuronalen Stammzellen des ZNS auf serumfreien Medien basieren (Richards et al, 1992; Gage et al,

1995; Ling et al, 1998; Carpenter et al, 1999), werden MSC bislang in nahezu allen Studien in serumhaltigen Medien expandiert.

Die Reduktion des Serumgehalts in der Zellkultur ist zwangsläufig mit dem Entzug wichtiger regulatorischer Substanzen verknüpft. Andererseits können mit dem Verfahren auch hemmende Einflüsse entfallen. So konnte für die mesenchymale KM-Population von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass sich in Kulturbedingungen mit niedrigem Serumanteil Vorläuferzellen anreichern lassen (Reyes et al, 2001; Pochampally et al, 2004) und ein höherer Differenzierungsgrad erzielt werden kann (Jiang et al, 2003; Wislet-Gendebien et al, 2003; Wislet-Gendebien et al, 2005). Untersuchungen an neuronalen Zellkulturen haben allerdings auch deutlich gemacht, dass Serumentzug oxidativen Stress und DNA-Fragmentation induziert (Atabay et al, 1996; Chan et al, 1999). Bei neuronalen wie mesenchymalen Zellen gleichermaßen kann die Reduktion des Serumanteils zu apoptotischem Zelltod führen (Liu & Zhu, 1999; Isahara et al, 1999; LeBlanc et al, 1999; Zhu et al, 2006).

Für die Verwendung fetalen Kälberserums ergaben sich in unseren Versuchsbedingungen folgende Ergebnisse: Die Auswertung der Daten in den unterschiedlichen statistischen Modellen zeigt in der Summe keinen Effekt einer Serumreduktion hinsichtlich neuronaler Differenzierung. Im Vergleich der Einzelexperimente der Versuchsreihe 4 (statistisches Modell 1) konnte kein eindeutiger Effekt serumreduzierter Kulturbedingungen festgestellt werden. In der quantitativen Analyse (statistisches Modell 2) zeigte sich wiederum ein Trend dahingehend, dass sich Kulturbedingungen mit einem minimalen Serumanteil günstig auf die Differenzierung auswirken, während Kulturbedingungen mit hohem Serumanteil eher weniger die Differenzierung fördern. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass der höhere Anteil an B3-positiven Zellen bei serumreduzierten Kulturbedingungen eine Stressantwort auf den Serumentzug darstellt. Ein deutlicher Einfluss des Serumanteils zeigte sich hingegen für die Variable Proliferation. In den vorgeschalteten Tests und im Vergleich der Einzelexperimente war mit der Reduktion des Serumanteils eine kontinuierliche Abnahme des Zellwachstums zu beobachten. Die Auswertung im gesonderten statistischen Modell ergab, dass die Zellen bei hohem (20%) und mittlerem (5%) Serumanteil gegenüber der Nicht-Anwesenheit von Serum deutlich besser proliferierten; für diese Kulturbedingungen ergaben sich signifikante Unterschiede (vgl. Ergebnisse 4.6.1.). Der Serumentzug bewirkte also durch den Wegfall exogen zugeführter Wachstumsfaktoren eine deutliche Wachstumshemmung. Offenbar ist es so, dass die in Serum enthaltenen Faktoren insbesondere für die Vermittlung von Adhäsion und Proliferation der Zellen von Bedeutung sind, während die neuronale Differenzierung durch die Anwesenheit von Serum nicht in auffälliger Weise beeinflusst wird. Die Interpretation anderer Einflussfaktoren neuronaler Differenzierung wird dadurch in unseren Untersuchungen jedenfalls erleichtert.

5.2.4. Einfluss der Beschichtung und des Trocknungsgrades

Es gibt zunehmend Erkenntnis darüber, dass die extrazelluläre Umgebung einen entscheidenden Rolle in der gezielten Differenzierung von Stammzellen spielt (Watt & Hogan, 2000; Rosso et al, 2004; Gregory et al, 2005; Chen et al, 2007a). Zahlreiche *in-vitro*-Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass der Übergang von undifferenzierten, teilungsfähigen Vorläuferzellen in differenzierte postmitotische Zellen in hohem Masse durch extrazelluläre Signale zu beeinflussen ist (Vicario-Abejón et al, 1995; McKay et al, 1997). Extrazelluläre Matrixkomponenten nehmen Einfluss auf Zellform und Phänotyp und modulieren Proliferations- und Differenzierungsprogramme vieler spezialisierter Zelltypen. In Untersuchungen an neuronalen Vorläuferzellen (Hall et al, 1987; Whittemore et al, 1999) und MSC konnte eindrücklich gezeigt werden, dass die Zellen in Abhängigkeit vom Kultursubstrat Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit verändern. Werden etwa die von Reyes

und Kollegen expandierten MPC auf Kollagen oder LAM anstelle von FN kultiviert, so exprimieren sie die für MSC typischen Oberflächenmarker CD44 und HLA-Klasse-I und büßen ihr Proliferationspotential teilweise ein. (Reyes et al, 2001). Verschiedentlich wurde an MSC nachgewiesen, dass Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine synergistisch wirken können (Fried et al, 1996; Kim et al, 2002; Qian & Saltzman, 2004; Hori et al, 2004). Mit der Vermittlung adhäsiver Eigenschaften wird insbesondere die Interaktion mit regulatorischen Proteinen erleichtert, die an der Zelloberfläche gebundenen oder in der Matrix angereichert sind. Nach Untersuchungen von Gronthos und Kollegen an der Stro-1-positiven-Fraktion humaner KM-Zellen sind es vorzugsweise β 1-Integrine mittels derer MSC mit den Matrixkomponenten LAM, FN und Kollagen interagieren (Gronthos et al, 2001).

Im Zusammenhang mit neuronaler Differenzierung ist insbesondere LAM von Bedeutung, da es im Vergleich mit anderen definierten Matrixmolekülen in besonderer Weise die neuronale Differenzierung und das Neuritenwachstum stimuliert. Laminine sind komplexe Glykoproteine und Bestandteil in allen Basallaminae; sie interagieren mit einer Reihe von Zelloberflächenrezeptoren und können dadurch eine Vielzahl von Effekten induzieren (Timpl, 1989). Der Einfluss von LAM auf axonales Wachstum und die Aussprossung von Neuriten wurde durch *in-vitro*-Untersuchungen an sympathischen (Edgar et al, 1984; Lein & Higgins, 1989) und hippokampalen Neuronen (Esch et al, 1999; Kam et al, 2001; Dertinger et al, 2002) verschiedentlich demonstriert (*reviewed* von Luckenbill-Edds, 1997). In der neuronalen Zellkultur begünstigt das adhäsive LAM die Bildung von Neuriten stärker als jedes andere Agens (Hall et al, 1987; Ernsberger & Rohrer, 1988; Smalheiser, 1991). Wie LAM vermittelt ebenso das Glykoprotein FN Zelladhäsion und fördert das Neuritenwachstum. Embryonale Neurone des peripheren Nervensystems (Humphries et al, 1988) werden ebenso wie Neurone des zentralen Nervensystems (Carbonetto et al, 1982; Bottenstein, 1986; Rogers et al, 1987 & 1989; Vicario-Abejón, 2004) in Kultur durch FN zur Neuritenextension stimuliert. Im Gegensatz zu den natürlichen Glykoproteinen LAM und FN handelt es sich bei den Substanzen PLL und PORN um synthetische Aminosäure-Polymere. Die beiden basischen Polymere finden klassischerweise Anwendung als Substratbeschichtung bei der Kultivierung unterschiedlicher neuronaler Zelltypen (Rüegg & Hefti, 1984; Banker & Goslin, 1998). Die Adhäsion bestimmter neuronaler Zelltypen kann dadurch in Kultur erhöht werden (Ernsberger & Rohrer, 1988). Verwendung finden auch kombinierte Beschichtungen, vorzugsweise mit LAM oder FN (Edgar et al, 1984; Ernsberger & Rohrer, 1988; Whittemore et al, 1999; Vicario-Abejón, 2004).

Der Einfluss extrazellulärer Matrixsubstanzen auf Wachstum und insbesondere neuronale Differenzierung MSC wurde bislang kaum systematisch analysiert. Kim und Kollegen untersuchten eine Reihe von Wachstumsfaktoren, verschiedene Zellkulturzusätze und extrazelluläre Matrixkomponenten. Der beste Effekt hinsichtlich neuronaler Differenzierung wurde mit einer Kombination von Vitamin-A-Säure, bFGF und FN erzielt. Bei diesen Kulturbedingungen zeigten 40% der kultivierten Zellen eine neuronale Morphologie und eine positive Färbereaktion für die neuronalen Marker NF-M, TuJ-1 und für Vimentin. Positive Reaktionen für Marker einer fortgeschrittenen neuronalen Differenzierung wie Tau und GFAP wurden aber nicht beobachtet (Kim et al, 2002). Die Bedeutung extrazellulärer Matrix für die neuronale Differenzierung unterstreichen besonders die Ergebnisse der beiden Forscher Qian und Saltzman (Qian & Saltzman, 2004). Sie verglichen Kulturbedingungen mit unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien hinsichtlich Expansion und neuronaler Differenzierung humaner MSC. Als Induktionsprotokoll diente eine in Anlehnung an die Arbeitsgruppe von Woodbury (Woodbury et al, 2000) etablierte Kultursequenz. Der Effekt der unterschiedlichen Kulturbedingungen wurde nach dem Anteil der Zellen, die den neuronalen Markers NSE exprimieren, und dem Ausmass dendritischer Verzweigung der Zellen beurteilt. Mit Matrigel™ als Substrat konnte mit 69% der höchste Anteil an Zellen mit positiver Reaktion für NSE und ausgeprägter dendritischer Verzweigung erzielt werden. Die Hauptkomponenten

von Matrigel™ sind LAM, Kollagen Typ IV, Entactin und Heparansulfat, zudem enthält es verschiedene Wachstumsfaktoren (Kleinman et al, 1986; Vukicevic et al, 1992). Der beobachtete Effekt muss daher als synergistische Wirkung der einzelnen Komponenten betrachtet werden. Hinsichtlich Proliferation zeigten sich in den Untersuchungen der beiden Forscher keine grossen Unterschiede. Lediglich für Poly-D-Lysin konnte ein inhibierender Effekt auf die Proliferation nachgewiesen werden.

Das komplexe Zusammenspiel regulatorischer Proteine, welche die Differenzierung von Zellen steuern, erschwert die genaue Bestimmung einzelner Signale erheblich. Die Zellkultur bietet die Möglichkeit, zumindest einfache Ursache-Wirkungsbeziehungen zu studieren. In unseren Versuchsreihen wurden als Vertreter extrazellulärer Matrixproteine die Substanzen LAM und FN getestet. Daneben fanden die Polyaminosäuren PLL und PORN als Kultursubstrat Verwendung. In den analytischen Tests zeigten sich signifikante Ergebnisse für sämtliche Beschichtungsmaterialien. Überraschend ist der Befund, dass die beiden Matrixproteine LAM und FN in der Kultur mit humanen MSC einen inhibierenden Einfluss auf die neuronale Differenzierung ausübten, fördern sie doch sonst das Neuritenwachstum. Offenbar ist es so, dass die extrazellulären Komponenten in der Mikroumgebung des KM eine andere Funktion erfüllen. So konnten etwa Untersuchungen von Chen und Kollegen mit Hilfe einer extrazellulären Matrixzubereitung adhärenter KM-Zellen zeigen, dass einzelne Komponenten, wie LAM und FN, für die Expansion von Vorläuferzellen und den Erhalt ihres Differenzierungspotentials von Bedeutung sind (Chen et al, 2007b). Es überrascht daher auch nicht, dass besonders vielversprechende Expansionsprotokolle mesenchymaler Vorläuferzellen auf einer Beschichtung mit FN basieren (Reyes et al, 2001; Kohyama et al, 2001; Verfaillie et al, 2003; D'Ippolito et al, 2004 & 2006). Durch die Vorbehandlung der OT mit den synthetischen Substraten PLL und PORN konnte dagegen der Anteil an vordifferenzierten Zellen in der Kulturbedingung erhöht werden. Während mit PLL das Wachstum der Zellen nicht auffällig beeinflusst wurde, zeigte PORN einen inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation. In den optimierten Kulturbedingungen der fünften Versuchsreihe konnte mit einer kombinierten Beschichtung ein zusätzlicher Effekt hinsichtlich neuronaler Differenzierung erreicht werden. Dieses Ergebnis unterstreicht den herausragenden Einfluss der Beschichtung in den Kulturbedingungen. Ausgeprägt positive Effekt der Beschichtungen mit LAM und FN zeigten sich hingegen hinsichtlich Proliferation der Zellen. Hilfreich für die Interpretation der Ergebnisse sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen der lichtmikroskopischen Auswertung: Zellen, die auf FN-beschichteten OT kultiviert wurden, wuchsen nämlich vorwiegend als flache spindelförmige Zellen und konfluieren stellenweise. Die hohe Zelldichte in den Kulturbedingungen hat das Ergebnis hinsichtlich neuronaler Differenzierung möglicherweise negativ beeinflusst, wenn man davon ausgeht, dass der Zell-Zell-Kontakt für die initiale Determinierung eines neuronalen Differenzierungsweg einen inhibierenden Effekt ausübt. Für den Trocknungsgrad zeigten sich in den verschiedenen Auswertungen keine Auffälligkeiten.

5.3. Ausblick

Die vorgelegte Untersuchung stellt einen ersten Schritt dar auf der Suche nach optimierten Kulturbedingungen für eine neuronale Differenzierung humaner MSC. Es muss wohl davon ausgegangen werden, dass analog zur Anzucht und neuronalen Induktion embryonaler und neuraler Stammzellen die neuronale Differenzierung MSC mehrere Stadien umfasst, die jeweils durch spezifische Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixkomponenten und zusätzliche Zellkulturzusätze beeinflusst werden. Diese Hypothese wird durch die Forschungsergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen untermauert. Die Untersuchungen machen allesamt deutlich, dass die fortgeschrittene neuronale Differenzierung MSC eine längere Kulturdauer und die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren erfordert (Ling et al, 1998; Verfaillie et al, 2003). Kokulturmodelle unterstreichen ferner die Bedeutung zum Teil noch nicht definierter humoraler und zellgebundener Faktoren (Sanchez-Ramos et al, 2000; Verfaillie et al, 2003; Joannides et al, 2003; Abouelfetouh et al, 2004; Bossolasco et al, 2005; Wislet-Gendebien et al, 2005; Lei et al, 2007). Ob die in den unterschiedlichen Studien beobachteten phänotypischen Veränderungen nach *in-vitro* Manipulation tatsächlich eine genuine Transdifferenzierung darstellen, muss in überzeugender Art und Weise bewiesen werden. Angesichts der teilweise ungenügenden Nachweise einer funktionellen Differenzierung wurden von verschiedenen Autoren eine Reihe von Erfüllungskriterien formuliert (Anderson et al, 2001; Blau et al, 2001; Svendsen et al, 2001; Rosenthal, 2003; Wagers et al, 2004; Ross & Verfaillie, 2008). Bislang konnte keine der veröffentlichten Studien hinsichtlich neuronaler Differenzierung MSC die Erfüllung sämtlicher Kriterien nachweisen.

Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen müssen in zukünftigen Untersuchungen weiter verbessert werden, um neuronale Vorläuferzellen aus adulten Geweben in ausreichender Zahl zu gewinnen und eine terminale Differenzierung zu erreichen. Für die Entwicklung neuronaler Zellen aus MSC wäre es gerade im Hinblick auf eine klinische Anwendung wünschenswert, den Anteil tierischen Serums in den Kulturprotokollen zu reduzieren oder ganz zu eliminieren. Die Verwendung von tierischem Produkt impliziert Gefahrenpotenzial, wie etwa die mögliche Übertragung infektiösen Materials oder die Induktion immunologischer Reaktionen. Alternativen stellen der Verzicht auf tierische Zusätze (Spees et al, 2004; Müller et al, 2006), die Verwendung autologen Serums (Koller et al, 1998; Stute et al, 2004; Schecroun & Delloye, 2004; Tonti & Mannello, 2008) oder künstlicher Serumersatz dar (Koller et al, 1998; Meuleman et al, 2006; Agata et al, 2009). Die Datenlage ist allerdings kontrovers. Untersuchungen an humanen Stromazellen haben gezeigt, dass eine Expansion unter Aussparung tierischen Serums prinzipiell möglich ist und zu vergleichbaren (Yamaguchi et al, 2002; Anselme et al, 2002; Stute et al, 2004) oder gar zu besseren Ergebnissen führt (Shigeno & Ashton, 1995; Schecroun & Delloye, 2004; Vogel et al, 2006). Die Zellen erhalten dabei ihr Differenzierungspotential (Vogel et al, 2006; Battula et al, 2007; Agata et al, 2009). Frühere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass optimale Kulturbedingungen nur durch fetales Kälberserum erreicht werden können (Wang et al, 1990; Koller et al, 1998; Kuznetsov et al, 2000). Die bislang von unterschiedlichen Autoren vorgestellten serumfreien Kulturbedingungen erfordern die Kombination von Wachstumsfaktoren und anderer Zellkulturzusätze (Gronthos & Simmons, 1995; Battula et al, 2007; Agata et al, 2009) oder gelingen überhaupt nicht (Kuznetsov et al, 1997). Limitierende Faktoren für die Verwendung autologen Serums sind die benötigte Menge für die Expansion MSC sowie Qualitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Spendercharakteristik. Die Anwendung kommerzieller Serumersatzlösungen erscheint daher in dieser Hinsicht unproblematischer. Ein neuer Standard gegenüber herkömmlichen Kulturbedingungen konnte allerdings bislang nicht etabliert werden (Korhonen, 2007; Mannello & Tonti, 2007). An die Entwicklung eines für die Kultivierung humaner MSC geeigneten serumfreien Protokolls sind zwei Anforderungen zu stellen: zum einen muss eine ausreichende Proliferation der Zellen

gewährleistet sein, zum anderen sollte die Kulturbedingung den Verlauf der neuronalen Differenzierung möglichst günstig beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist etwa zu untersuchen, ob die Wachstumshemmung serumfreier Kulturbedingungen zum Teil durch adhäsive und proliferationsvermittelnde Beschichtungen kompensiert werden kann.

Die hier vorgelegte Untersuchung epigenetischer Stimuli wie Wachstumsfaktoren und anderer Zellkulturzusätze mag dazu beitragen, die Anforderungen einer *in-vitro* Kultur zur neuronalen Differenzierung MSC besser zu verstehen und die kaum zugänglichen Prozesse im Organismus aufzuklären. Die Erkenntnisse daraus mögen auch indirekt Aufschlüsse über die komplexen und bislang wenig verstandenen Mechanismen geben, welche die Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung von Stammzellen regeln. Insbesondere die Mechanismen, die eine Balance zwischen Proliferation, Überleben und Differenzierung regeln, sind komplex und bislang wenig verstanden.

Ob und inwieweit adulte Stammzellen für den Zellersatz genutzt werden können, wird entscheidend von der Überwindung zweier Schlüsselprobleme abhängen. Einerseits muss es gelingen, den Differenzierungsprozess gezielt *in-vitro* nachzuvollziehen. Andererseits ist es notwendig, die Zellen in einer klinisch signifikanten Größenordnung *in-vitro* zu vermehren. Die Erkenntnis, dass Differenzierung und Proliferation in der Zellkultur entgegengesetzte Prozesse sind, könnte sich als schwer überwindbares Hindernis herauskristallisieren. Die Lösung dieser Probleme bedarf daher weiterhin intensiver Untersuchungen auf dem Gebiet der Grundlagenforschung.

6. Zusammenfassung

Um in Zukunft adulte humane Stammzellen klinisch einsetzen zu können, bedarf es einer Optimierung und weitgehender Standardisierung der Kulturbedingungen dieser Zellen, um so in möglichst kurzer Zeit eine möglichst große Anzahl möglichst differenzierter Zellen zu gewinnen. Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit die Bedingungen, unter denen eine neuronale *in-vitro*-Differenzierung primärer humaner MSC beobachtet werden können, analysiert. Dafür wurde eine systematische Untersuchung unterschiedlicher Einflussfaktoren von Proliferation und neuronaler Differenzierung unternommen. Durch die absichtlich gewählte kurze Kulturdauer von 6 Tagen wurden vor allem jene Faktoren untersucht, die für die initiale Determinierung eines neuronalen Differenzierungsweges relevant sind.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Determinierung eines neuronalen Differenzierungsweges von mehreren Faktoren beeinflusst werden kann:

Das Testen unterschiedlicher Kulturmedien ergab, dass die Verwendung nährstoffreicher Medien wie F12 und Neurobasal™ und zusätzlicher Supplemente wie B27 und N2 zu favorisieren ist. Die Ergebnisse lieferten ebenso Hinweise darauf, dass die Anwesenheit antioxidativer Substanzen für die neuronale Differenzierung möglicherweise von Vorteil ist. Für die Verwendung tierischen Serums zeigten sich in der Summe keine Effekte hinsichtlich neuronaler Differenzierung. Mit der Reduktion des Serumanteils in den Kulturbedingungen wurde allerdings eine deutliche Abnahme der Zellproliferation beobachtet. Auf einen minimalen Serumanteil in den Kulturbedingungen konnte daher nicht verzichtet werden.

Mit den Ergebnissen unserer Beschichtungsexperimente konnten wir zeigen, dass extrazelluläre Matrixmoleküle das Zellschicksal erheblich beeinflussen. Anders als aus Untersuchungen mit neuronalen Zellkulturen bekannt, hatten die beiden Matrixproteine LAM und FN einen inhibierenden Einfluss auf die neuronale Differenzierung humaner KM-Zellen gezeigt. In unseren Untersuchungen förderten LAM und FN besonders die Proliferation MSC, während die synthetischen Adhäsionsmoleküle, insbesondere PORN, die neuronale Differenzierung förderten. Der Trocknungsgrad der unterschiedlichen Beschichtungen hatte in unseren Studien keinen Einfluss auf neuronale Differenzierung oder Proliferation der Zellen.

Alle untersuchten Wachstumsfaktoren zeigten einen signifikanten Effekt hinsichtlich neuronaler Differenzierung. Einzeln konnte für keinen der Faktoren eine Überlegenheit gegenüber FGF-2 nachgewiesen werden. Interessant war die Beobachtung, dass durch die Kombination einzelner Wachstumsfaktoren ein höherer Anteil vordifferenzierter Zellen erzielt werden konnte. Die Kombination der neu eingeführten Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH erschien besonders aussichtsreich. Verglichen mit FGF-2 als Einzelfaktor erwies sich die gleichzeitige Anwendung der beiden Faktoren effektiver hinsichtlich neuronaler Differenzierung. Für FGF-2 und die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren FGF-8b und SHH konnten gegenüber den neurotrophen Faktoren NT-3 und BDNF zusätzliche additive Effekte auf die neuronale Differenzierung humaner mesenchymaler KM-Zellen nachgewiesen werden. Hinsichtlich Proliferation liessen sich keine eindeutig positiven Effekte einzelner Faktoren nachweisen. Im Gegenteil, für stark differenzierende Kulturbedingungen wurde eine auffällige Inhibition der Zellproliferation registriert. Überhaupt konnte über alle Versuchsreihen hinweg eine negative Assoziation zwischen der Zellproliferation und dem Anteil neuronal vordifferenzierte Zellen festgestellt werden.

Wichtig im Hinblick auf zukünftige klinische Anwendungsmöglichkeiten humaner MSC erscheint uns ein weiteres Ergebniss unserer Untersuchungen: Die in unseren Experimenten verwendeten Zell-Linien, die jeweils von anderen Spendern stammten, unterschieden sich teilweise signifikant in ihrer Antwort auf die untersuchten Einflussfaktoren. Ursächlich hierfür könnte die Verwendung einer nicht klar definierten und eines heterogenen Ausgangsmaterials sein. Andererseits könnten die beobachteten Unterschiede in der Response auf die experimentellen Stimuli auch auf die Spendercharakteristik zurückzuführen sein. Vorbestehende Erkrankungen, Alter, Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit oder Medikamenteneinnahme könnten wichtige Determinanten darstellen. So ergaben sich bereits in früheren Untersuchungen Hinweise auf eine Korrelation zwischen Proliferation der Spenderzellen und dem Alter der Spender (Shigeno & Ashton, 1995; Stolzing et al, 2008). Der Einfluss qualitativer Eigenschaften von Spenderzellen wurde aber bislang im Bereich der adulten Stammzellforschung kaum untersucht.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
B3Minus	β -III-Tubulin fluoreszenznegative Zellen
B3Null	β -III-Tubulin intermediär positive Zellen
B3Plus	β -III-Tubulin fluoreszenzpositive Zellen
BDNF	<i>Brain-derived neurotropic factor</i>
BHA	Butylhydroxyanisol
BME	β -Mercaptoethanol
BMNC	<i>Bone marrow mononuclear cell(s)</i>
BMSC	<i>Bone marrow-derived multipotent stem cell(s)</i>
bzw.	beziehungsweise
β	Beta
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CFU-F	<i>Colony forming unit-fibroblasts</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
dbcAMP	Dibutyryl-cyclisches-Adenosin-3',5'-Monophosphat
DMEM	<i>Dublecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DPBS	Dublecco's Phosphat-gepufferte Saline
EGF	<i>Epidermal-growth-factor</i>
ES	Embryonale Stammzelle(n)
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc-Block	<i>Fragment crystallizable-</i> Rezeptor-Block
FCS	Fetales Kälberserum
FGF β	Fibroblastenwachstumsfaktor β
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (= bFGF, basic-FGF)
FGF-8b	Fibroblastenwachstumsfaktor 8b
FN	Fibronektin
GF	<i>growth-factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glukose
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
Hep (= HEP)	Heparin
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen DR-1

hmNSC	<i>Human marrow-derived neural stem cell-like cells</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
Inc.	<i>Incorporated Company</i>
kD	kiloDalton
KM	Knochenmark
kPa	kiloPascal
LAM	Laminin
Ln	<i>Logarithmus naturalis</i>
MAP-2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MAPC	<i>Multipotent adult progenitor cell(s)</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
MIAMI	<i>Marrow-isolated adult multilineage inducible cell(s)</i>
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPC	<i>Mesodermal progenitor cell(s)</i>
MSC	Mesenchymale Stromazelle(n); <i>marrow stomaal cell(s)</i>
µg	Mikrogramm
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
NF-L	<i>Neurofilament-light</i>
NF-M	<i>Neurofilament-medium</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NSC	Neuronale Stammzelle(n)
NSE	<i>Neuron-specific enolase</i>
NT-3	Neurotrophin 3
OT	Objektträger
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pCREB/CREB	<i>(phosphorylated) cAMP response element-binding protein</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
Pen./Strept.	Penicillin/Streptomycin
pH	Potentia hydrogenii
PFA	Paraformaldehyd
PI	Proliferations-Index
PLL	Poly-L-Lysin
PORN	Poly-L-Ornithin
ROCK	<i>Rho and Rho-activated kinase</i>
RS-Zellen	<i>Recycling stem cell(s)</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Sca-1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
Tau	Tau Protein
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TrkA	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>
TuJ-1	<i>Neuron-specific class III β-tubulin</i>
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
ZNS	Zentralnervensystem

7.2. *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Differenzierungspotenzial MSC	5
Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis des neuronalen Proteins β -III-Tubulin.....	39
Abbildung 3: Neuronale Differenzierung in unterschiedlichen Medien	40
Abbildung 4: Immunhistochemie (unterschiedliche Medien).....	41
Abbildung 5: Neuronale Differenzierung mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren	42
Abbildung 6: Immunhistochemie (unterschiedliche Wachstumsfaktoren)	43
Abbildung 7: Neuronale Differenzierung mit unterschiedlichen Beschichtungen	43
Abbildung 8: Immunhistochemie (unterschiedliche Beschichtungen)	45
Abbildung 9: Neuronale Differenzierung bei variierendem Serumanteil (F12)	45
Abbildung 10: Neuronale Differenzierung bei variierendem Serumanteil (MEM)	46
Abbildung 11: Immunhistochemie (unterschiedliche Wachstumsfaktoren, FCS 1%)	47
Abbildung 12: Neuronale Differenzierung mit "Best off"-Protokoll (unbeschichtet)	47
Abbildung 13: Neuronale Differenzierung mit "Best off"-Protokoll (beschichtet)	48
Abbildung 14: Immunhistochemie (optimierte Kulturbedingungen).....	50
Abbildung 15: Proliferation in unterschiedlichen Medien	51
Abbildung 16: Proliferation mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren	52
Abbildung 17: Proliferation mit unterschiedlichen Beschichtungen	53
Abbildung 18: Proliferation bei variierendem Serumanteil (F12)	54
Abbildung 19: Proliferation bei variierendem Serumanteil (MEM)	55
Abbildung 20: Proliferation mit "Best-off"-Protokoll (unbeschichtet)	56
Abbildung 21: Proliferation mit "Best-off"-Protokoll (beschichtet)	56

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums MEM.....	22
Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums MEM_glc.....	23
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mediums MEM_hep.....	23
Tabelle 4: Zusammensetzung des Mediums F12_B27.....	23
Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums F12_N2.....	23
Tabelle 6: Zusammensetzung des Mediums MEM_nuk.....	24
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mediums DMEM.....	24
Tabelle 8: Zusammensetzung des Medium Neurob_B27.....	24
Tabelle 9: Zusammensetzung des N2-Supplements.....	24
Tabelle 10: Arbeitsschritte für die Beschichtung PLL_dry.....	25
Tabelle 11: Arbeitsschritte für die Beschichtung PORN_dry.....	25
Tabelle 12: Arbeitsschritte für die Beschichtung PLL_PORN_dry.....	26
Tabelle 13: Arbeitsschritte für die Beschichtung LAM_dry.....	26
Tabelle 14: Arbeitsschritte für die Beschichtung PORN_LAM_dry.....	26
Tabelle 15: Arbeitsschritte für die Beschichtung FN_dry.....	27
Tabelle 16: Arbeitsschritte für die Beschichtung FN_LAM_dry.....	27
Tabelle 17: Übersicht der fünf Versuchsreihen.....	28
Tabelle 18: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung.....	29
Tabelle 19: Grundstruktur der angewandten statistischen Modelle.....	32
Tabelle 20: Schematische Repräsentation der lichtmikroskopischen Befunde.....	35
Tabelle 21: Statistik (globale Analyse) für Differenzierung (Zell-Linien).....	36
Tabelle 22: Statistik (globale Analyse) für Proliferation (Zell-Linien).....	36
Tabelle 23: Statistik (globale Analyse) für Differenzierung (Kulturfaktoren).....	37
Tabelle 24: Statistik (globale Analyse) für Proliferation (Kulturfaktoren).....	38
Tabelle 25: <i>Residual</i> SSCP Matrix über das gesamte Datenmaterial.....	39
Tabelle 26: Statistik (Modell 1) für Differenzierung (Medien).....	41
Tabelle 27: Statistik (Modell 1) für Differenzierung (Wachstumsfaktoren).....	42
Tabelle 28: Statistik (Modell 1) für Differenzierung (Beschichtung).....	44
Tabelle 29: Statistik (Modell 1) für Differenzierung (Serumanteil).....	46
Tabelle 30: Statistik (Modell 1) für Differenzierung ("Best off"-Protokoll).....	48
Tabelle 31: Statistik (Modell 1) für Proliferation (Medien).....	51
Tabelle 32: Statistik (Modell 1) für Proliferation (Wachstumsfaktoren).....	52
Tabelle 33: Statistik (Modell 1) für Proliferation (Beschichtung).....	54
Tabelle 34: Statistik (Modell 1) für Proliferation (Serumanteil).....	55
Tabelle 35: Statistik (Modell 1) für Proliferation ("Best off"-Protokoll).....	57
Tabelle 36: Statistik (Modell 2) für Differenzierung (Medien).....	58
Tabelle 37: Statistik (Modell 2) für Proliferation (Medien).....	58
Tabelle 38: Statistik (Modell 4) für Differenzierung (Versuchsreihe 1).....	58
Tabelle 39: Statistik (Modell 4) für Proliferation (Versuchsreihe 1).....	59
Tabelle 40: Statistik (Modell 2) für Differenzierung (Serumanteil).....	59
Tabelle 41: Statistik (Modell 2) für Proliferation (Serumanteil).....	59
Tabelle 42: Statistik (Modell 3) für Differenzierung (FGF-2).....	60
Tabelle 43: Statistik (Modell 3) für Proliferation (FGF-2).....	60
Tabelle 44: Statistik (Modell 5) für Differenzierung (FGF-8b, SHH, Heparin).....	61
Tabelle 45: Statistik (Modell 5) für Proliferation (FGF-8b, SHH, Heparin).....	61
Tabelle 46: Statistik (Modell 6) für Differenzierung (Beschichtung).....	62
Tabelle 47: Statistik (Modell 6) für Proliferation (Beschichtung).....	62
Tabelle 48: Statistik (Modell 7) für Differenzierung (Supplemente B27 und N2).....	63

Tabelle 49: Statistik (Modell 7) für Proliferation (Supplemente B27 und N2)	63
Tabelle 50: Statistik (Modell 8) für Differenzierung (Wachstumsfaktoren, FCS 1%)	63
Tabelle 51: Statistik (Modell 8) für Proliferation (Wachstumsfaktoren, FCS 1%)	64

8. Literaturverzeichnis

- Abouelfetouh, A., Kondoh, T. et al. (2004). "Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice." *Brain Research* 1029 (1): 114-119.
- Agata, H., Watanabe, N. et al. (2009). "Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 (2): 353-8.
- Aggarwal, S. und Pittenger M. F. (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* 105 (4): 1815-22.
- Ahmed, S., Reynolds, B. A. et al. (1995). "BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors." *J. Neurosci.* 15 (8): 5765-78.
- Akiyama, Y., Radtke, C. et al. (2002a). "Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells." *J. Neurosci.* 22(15): 6623-30.
- Akiyama, Y., Radtke C. et al. (2002b). "Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells." *Glia* 39 (3): 229-36.
- Albera, C., Polak, J. M. et al. (2005). "Repopulation of human pulmonary epithelium by bone marrow cells: a potential means to promote repair." *Tissue Engineering* 11 (7-8): 1115-21.
- Alison, M. R., Lovell, M. J. et al. (2006). "Stem cell plasticity and tumour formation." *European Journal of Cancer* 42 (9): 1247-56.
- Amit, M., Carpenter, M. K. et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." *Developmental Biology* 227 (2): 271-78.
- Anderson, D. J., Gage, F. H. et al. (2001). "Can stem cells cross lineage boundaries?" *Nature Medicine* 7(4): 393-95.
- Ankeny, D. P., McTigue, D. M. et al. (2004). "Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats." *Experimental Neurology* 190 (1): 17-31.
- Anselme, K., Broux, O. et al. (2002). "In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering." *Tissue Engineering* 8 (6): 941-53.
- Arsenijevic, Y. und Weiss, S. (1998). "Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor." *J. Neurosci.* 18 (6): 2118-28.
- Assmus, B., Schächinger, V. et al. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." *Circulation* 106 (24): 3009-17.

- Atabay, C., Cagnoli, C. M. et al. (1996). "Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists." *J. Neurosci. Res.* 43 (4): 465-75.
- Avila, M. A., Varela-Nieto, I. et al. (1993). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 support the survival and neuritogenesis response of developing cochleovestibular ganglion neurons." *Developmental Biology* 159 (1): 266-75.
- Azizi, S. A., Stokes, D. et al. (1998). "Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats: similarities to astrocyte grafts." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3908-13.
- Badiavas, E. V., Abedi, M. et al. (2003). "Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing." *Journal of Cellular Physiology* 196 (2): 245-50.
- Baksh, D., Song, L. et al. (2004). "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (3): 301-16.
- Baksh, D., Yao, R. et al. (2007). "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow." *Stem Cells* 25 (6): 1384-92.
- Balsam, L. B., Wagers, A. J. et al. (2004). "Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium." *Nature* 428 (6983): 668-73.
- Bang, O. Y., Lee, J. S. et al. (2005). "Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients." *Annals of Neurology* 57 (6): 874-82.
- Bang, Y. J., Pirnia, F. et al. (1994). "Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (12): 5330-5334.
- Barnabé-Heider, F. und Miller, F. D. (2003). "Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways." *J. Neurosci.* 23 (12): 5149-60.
- Barzilay, R., Kan, I. et al. (2008). "Induction of human mesenchymal stem cells into dopamine-producing cells with different differentiation protocols." *Stem cells and Development* 17 (3): 547-54.
- Battula, V. L., Bareiss, P. M. et al. (2007). "Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation." *Differentiation* 75 (4): 279-91.
- Baxter, M. A., Wynn, R. F. et al. (2002). "Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I." *Blood* 99 (5): 1857-59.

- Becker, A.J., McCulloch, E.A. und Till, J.E. (1963) "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." *Nature* 197 (4866):452-4.
- Bertani, N., Malatesta, P. et al. (2005). "Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 17): 3925-36.
- Bianchi, G., Banfi, A. et al. (2003). "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2." *Experimental Cell Research* 287 (1): 98-105.
- Bianco, P., Riminucci, M. et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." *Stem Cells* 19 (3): 180-192.
- Bikfalvi, A., Klein, S. et al. (1997). "Biological roles of fibroblast growth factor-2." *Endocrine reviews* 18 (1): 26-45.
- Birren, S. J., Lo, L. et al. (1993). "Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence." *Development* 119 (3): 597-610.
- Bito, H., Furuyashiki, T. et al. (2000). "A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons." *Neuron* 26 (2): 431-41.
- Blau, H. M., Brazelton, T. R. et al. (2001). "The evolving concept of a stem cell: entity or function?" *Cell* 105 (7): 829-41.
- Blondheim, N. R., Levy, Y. S. et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition." *Stem Cells and Development* 15 (2): 141-64.
- Boheler, K. R. (2004). "Functional markers and the "homogeneity" of human mesenchymal stem cells." *The Journal of Physiology* 554 (Pt 3): 592.
- Bonhoeffer, T. (1996). "Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex." *Current opinion in Neurobiology* 6 (1): 119-26.
- Bonilla, S., Alarcón, P. et al. (2002). "Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain." *Eur. J. Neurosci.* 15 (3): 575-82.
- Borlongan, C. V., Lind, J. G. et al. (2004). "Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats." *Brain Research* 1010 (1-2): 108-16.
- Borue, X., Lee, S. et al. (2004). "Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing." *The American journal of Pathology* 165 (5): 1767-72.
- Bossolasco, P., Corti, S. et al. (2004). "Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells." *Experimental Cell Research* 295 (1): 66-78.
- Bossolasco, P., Cova, L. et al. (2005). "Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro." *Experimental Neurology* 193 (2): 312-25.

- Bottenstein, J. E. (1986). "Growth requirements in vitro of oligodendrocyte cell lines and neonatal rat brain oligodendrocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83 (6): 1955-59.
- Bottenstein, J. E. und Sato, G. H. (1979). "Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (1): 514-17.
- Bouvier, M. M. und Mytilineou, C. (1995). "Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro." *J. Neurosci.* 15 (11): 7141-49.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V. et al. (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." *Science* 290 (5497): 1775-79.
- Brewer, G. J. (1995). "Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus." *J. Neurosci. Res.* 42 (5): 674-83.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R. et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." *J. Neurosci. Res.* 35 (5): 567-76.
- Brewer, G. J. und Cotman, C. W. (1989). "Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen." *Brain Research* 494 (1): 65-74.
- Brunner, G., Gabrilove, J. et al. (1991). "Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan." *The Journal of Cell Biology* 114 (6): 1275-83.
- Brunner, G., Nguyen, H. et al. (1993). "Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells." *Blood* 81 (3): 631-38.
- Bruscia, E. M., Price, J. E. et al. (2006). "Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (8): 2965-70.
- Bunone, G., Mariotti, A. et al. (1997). "Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells." *Oncogene* 14 (12): 1463-70.
- Caccamo, D., Katsetos, C. D. et al. (1989a). "Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium." *Laboratory Investigation* 60 (3): 390-98.
- Caccamo, D. V., Herman, M. M. et al. (1989b). "An immunohistochemical study of neuropeptides and neuronal cytoskeletal proteins in the neuroepithelial component of a spontaneous murine ovarian teratoma. Primitive neuroepithelium displays immunoreactivity for neuropeptides and neuron-associated beta-tubulin isotype." *The American Journal of Pathology* 135 (5): 801-13.

- Caddick, J., Kingham, P. J. et al. (2006). "Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a Schwann cell lineage." *Glia* 54 (8): 840-49.
- Canzoniere, D., Farioli-Vecchioli, S. et al. (2004). "Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1." *J. Neurosci.* 24(13): 3355-69.
- Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." *Clinics in plastic surgery* 21 (3): 429-35.
- Caplan, A. I. und Dennis, J. E. (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." *Journal of Cellular Biochemistry* 98 (5): 1076-84.
- Carbonetto, S. T., Gruver, M. M. et al. (1982). "Nerve fiber growth on defined hydrogel substrates." *Science* 216 (4548): 897-99.
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S. et al. (2001). "Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells." *Experimental Neurology*. 172: 383-97.
- Carpenter, M. K., Cui, X., et al. (1999). "In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells." *Experimental Neurology* 158 (2): 265-78.
- Castro, R. F., Jackson, K. A. et al. (2002). "Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo." *Science* 297 (5585): 1299.
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E. et al. (1980). "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny." *Blood* 56 (2): 289-301.
- Chamberlain, J., Yamagami, T. et al. (2007). "Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep." *Hepatology* 46 (6): 1935-45.
- Chamberlain, J. R., Deyle, D. R. et al. (2008). "Gene targeting of mutant COL1A2 alleles in mesenchymal stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta." *Molecular Therapy* 16 (1): 187-93.
- Chamberlain, J. R., Schwarze, U. et al. (2004). "Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta." *Science* 303 (5661): 1198-1201.
- Chan, S. L., Tammariello, S. P. et al. (1999). "Prostate apoptosis response-4 mediates trophic factor withdrawal-induced apoptosis of hippocampal neurons: actions prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation." *Journal of Neurochemistry* 73 (2): 502-12.
- Charwat, S., Gyöngyösi, M. et al. (2008). "Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art." *Experimental Hematology* 36 (6): 672-80.
- Chen, J., Li, Y. et al. (2004a). "Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis." *Brain Research* 1005 (1-2): 21-28.
- Chen, J., Li, Y. et al. (2003). "Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat." *J. Neurosci. Res.* 73 (6): 778-86.

- Chen, J., Li, Y. et al. (2001a). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." *Stroke* 32: 1005-11.
- Chen, J., Li, Y. et al. (2000). "Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat." *Neuropharmacology* 39 (5): 711-16.
- Chen, S. S., Fitzgerald, W. et al. (2007a). "Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation." *Stem Cells* 25 (3): 553-61.
- Chen, X. D., Dusevich, V. et al. (2007b). "Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts." *Journal of bone and mineral research* 22 (12): 1943-56.
- Chen, S. L., Fang, W. W. et al. (2004b). "Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction." *The American journal of Cardiology* 94 (1): 92-95.
- Cheng, Y., Black, I. B. et al. (2002). "Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF." *Eur. J. Neurosci.* 15 (1): 3-12.
- Cho, K. J., Trzaska, K. A. et al. (2005). "Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 alpha." *Stem Cells* 23 (3): 383-391.
- Chopp, M., Zhang, X. H. et al. (2000). "Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation." *Neuroreport* 11: 3001-3005.
- Chuah, M. K., Brems, H. et al. (1998). "Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy of hemophilia A." *Human gene therapy* 9 (3): 353-365.
- Chuah, M. K., Collen, D. et al. (2001). "Gene therapy for hemophilia." *The Journal of Gene Medicine* 3 (1): 3-20.
- Chuah, M. K., Van Damme, A. et al. (2000). "Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice." *Human gene therapy* 11 (5): 729-738.
- Ciapetti, G., Ambrosio, L. et al. (2006). "Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering." *Biomaterials* 27 (36): 6150-6160.
- Ciccolini, F. (2001). "Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development." *Mol. Cell. Neurosci.* 17 (5): 895-907.
- Ciccolini, F. und Svendsen, C. N. (1998). "Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2." *J. Neurosci.* 18 (19): 7869-7880.
- Cogle, C. R., Yachnis, A. T. et al. (2004). "Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study." *The Lancet* 363 (9419): 1432-1437.

- Colter, D. C., Class, R. et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 3213-3218.
- Colter, D. C., Sekiya, I., Prockop, D. J. (2001). "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 7841-7845.
- Conget, P. A. und Minguell, J. J. (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." *Journal of Cellular Physiology* 181 (1): 67-73.
- Correia, A. S., Anisimov, S. V. et al. (2005). "Stem cell-based therapy for Parkinson's disease." *Annals of Medicine* 37 (7): 487-498.
- Corti, S., Locatelli, F. et al. (2002a). "Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia." *J. Neurosci. Res.* 70 (6): 721-733.
- Corti, S., Locatelli, F. et al. (2002b). "Modulated generation of neuronal cells from bone marrow by expansion and mobilization of circulating stem cells with in vivo cytokine treatment." *Experimental Neurology* 177 (2): 443-452.
- Corti, S., Locatelli, F. et al. (2002c). "Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia." *J. Neurosci. Res.* 70 (6): 721-733.
- Corti, S., Locatelli F. et al. (2004). "Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8 (3): 329-337.
- Cox, M. E., Deeble, P. D. et al. (1999). "Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression." *Cancer Research* 59 (15): 3821-3830.
- Coyne, T. M., Marcus, A. J. et al. (2006). "Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia." *Stem Cells* 24 (11): 2483-2492.
- Craig, C. G., Tropepe, V. et al. (1996). "In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain." *J. Neurosci.* 16 (8): 2649-2658.
- Croft, A. P. und Przyborski, S. A. (2004). "Generation of neuroprogenitor-like cells from adult mammalian bone marrow stromal cells in vitro." *Stem Cells and Development* 13 (4): 409-420.
- Cui, H.-F. und Bai, Z.-L. (2003). "Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis." *WJG* 9 (10): 2274-2277.
- Davies, A. M. (1994). "The role of neurotrophins in the developing nervous system." *Journal of Neurobiology* 25 (11): 1334-1348.

- Davies, A. M., Thoenen, H. et al. (1986). "The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor." *J. Neurosci.* 6 (7): 1897-1904.
- Hemptinne de, I., Vermeiren, C. et al. (2004). "Induction of glial glutamate transporters in adult mesenchymal stem cells." *Journal of Neurochemistry* 91 (1): 155-166.
- Dechant, G., Rodríguez-Tébar, A. et al. (1993). "Specific high-affinity receptors for neurotrophin-3 on sympathetic neurons." *J. Neurosci.* 13 (6): 2610-2616.
- Deloulme, J. C., Gensburger, C. et al. (1991). "Effects of basic fibroblast growth factor on the development of GABAergic neurons in culture." *Neuroscience* 42 (2): 561-568.
- Deng, J., Petersen, B. E. et al. (2006). "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation." *Stem Cells* 24 (4): 1054-1064.
- Deng, W., Obrocka, M. et al. (2001). "In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 148-52.
- Dennis, J., Carbillet, J.-P. et al. (2002). "The STRO-1+ marrow cell population is multipotential." *Cells Tissues Organs* 170 (2): 73-82.
- Dertinger, S. K. W., Jiang, X. et al. (2002). "Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(20): 12542-12547.
- Deschaseaux, F., Gindraux, F. et al. (2003). "Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype." *British Journal of Haematology* 122 (3): 506-517.
- Deschaseaux, F., Selmani, Z. et al. (2004). "CD49a positive bone marrow fraction of cells contained mesenchymal stem cells and endothelial progenitors: an in vitro evaluation." *International Journal of Cardiology* 95: 67.
- Dezawa, M., Kanno, H. et al. (2004). "Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation." *J. Clin. Invest.* 113 (12): 1701-1710.
- DiCicco-Bloom, E., Friedman W. J. et al. (1993). "NT-3 stimulates sympathetic neuroblast proliferation by promoting precursor survival." *Neuron* 11 (6): 1101-1111.
- Digirolamo, C. M., Stokes, D. et al. (1999). "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate." *British Journal of Haematology* 107 (2): 275-281.
- D'Ippolito, G., Diabira, S. et al. (2004). "Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 14): 2971-2981.

- D'Ippolito, G., Howard, G. A. et al. (2006a). "Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells." *Experimental Hematology* 34 (11): 1608-1610.
- D'Ippolito, G., Diabira, S. et al. (2006b). "Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells." *Bone* 39 (3): 513-522.
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C. et al. (1999). "Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow." *Journal of bone and mineral Research* 14 (7): 1115-1122.
- Dominici, M., Le Blanc, K. et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8 (4): 315-317.
- Dono, R. (2003). "Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function." *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284 (4): R867-R881.
- Dono, R., Texido, G. et al. (1998). "Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice." *The EMBO journal* 17 (15): 4213-4225.
- Doyonnas, R., LaBarge, M. A. et al. (2005). "Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (37): 13507-12.
- Edgar, D., Timpl, R. et al. (1984). "The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival." *The EMBO journal* 3 (7): 1463-1468.
- Eglitis, M. A., Dawson, D. et al. (1999). "Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain." *Neuroreport* 10: 1289-1292.
- Eglitis, M. A. und Mezey, E. (1997). "Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (8): 4080-4085.
- Egusa, H., Schweizer, F. E. et al. (2005). "Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing." *The Journal of biological chemistry* 280 (25): 23691-23697.
- Emami, S., Merrill, W. et al. (1997). "Enhanced growth of canine bone marrow stromal cell cultures in the presence of acidic fibroblast growth factor and heparin." *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 33 (7): 503-511.
- Erbs, S., Linke, A. et al. (2005). "Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study." *Circulation Research* 97 (8): 756-762.

- Erbs, S., Linke, A. et al. (2007). "Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial." *Circulation* 116 (4): 366-374.
- Erdö, F., Bührle, C. et al. (2003). "Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23 (7): 780-785.
- Ericson, J., Muhr, J. et al. (1995). "Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube." *Cell* 81 (5): 747-756.
- Ernsberger, U. und Rohrer, H. (1988). "Neuronal precursor cells in chick dorsal root ganglia: differentiation and survival in vitro." *Developmental Biology* 126 (2): 420-432.
- Esch, T., Lemmon, V. et al. (1999). "Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons." *J. Neurosci.* 19 (15): 6417-6426.
- Esneault, E., Pacary, E. et al. (2008). "Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats." *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 28 (9): 1552-1563.
- Fanarraga, M. L., Avila, J. und Zabala, J. C. (1999). "Expression of unphosphorylated class III β -tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation." *Eur. J. Neurosci.* 11: 517-527.
- Fang, T.-C., Otto, W. R. et al. (2008). "Exogenous bone marrow cells do not rescue non-irradiated mice from acute renal tubular damage caused by HgCl₂, despite establishment of chimaerism and cell proliferation in bone marrow and spleen." *Cell Proliferation* 41 (4): 592-606.
- Fariñas, I., Jones, K. R. et al. (1994). "Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3." *Nature* 369 (6482): 658-661.
- Fernández-Avilés, F., San Román, J. A. et al. (2004). "Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction." *Circulation Research* 95 (7): 742-748.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G. et al. (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* 279: 1528-1530.
- Ferrari, G., Minozzi, M. C. et al. (1989). "Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture." *Developmental Biology* 133 (1): 140-147.
- Ferrari, G., Toffano, G. et al. (1991). "Epidermal growth factor exerts neuronotrophic effects on dopaminergic and GABAergic CNS neurons: comparison with basic fibroblast growth factor." *J. Neurosci. Res.* 30 (3): 493-497.

- Ferreira, A. und Caceres, A. (1992). "Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture." *J. Neurosci. Res.* 32 (4): 516-529.
- Freed, C. R., Greene, P. E. et al. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." *N. Engl. J. Med.* 344 (10): 710-719.
- Freeman, T. B., Cicchetti, F. et al. (2000). "Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (25): 13877-13882.
- Fricker, R. A., Carpenter M. K. et al. (1999). "Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain." *J. Neurosci.* 19 (14): 5990-6005.
- Fried, A., Shamay, A. et al. (1996). "Phenotypic expression of marrow cells when grown on various substrata." *Journal of Cellular Biochemistry* 61 (2): 246-254.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." *Experimental Hematology* 4 (5): 267-274.
- Friedenstein, A. J., Latzinik, N. W. et al. (1982). "Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges." *Experimental Hematology* 10(2): 217-227.
- Fuchs, S., Kornowski, R. et al. (2006). "Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease." *The American journal of Cardiology* 97 (6): 823-829.
- Fukuchi, Y., Nakajima, H. et al. (2004). "Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential." *Stem Cells* 22 (5): 649-658.
- Gage, F. H., Coates, P. W. et al. (1995). "Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (25): 11879-11883.
- Gage, F. H., Ray, J., Fisher, L. J. (1995). "Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS." *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 159-192.
- Galli, R., Pagano, S. F. et al. (2000). "Regulation of neuronal differentiation in human CNS stem cell progeny by leukemia inhibitory factor." *Developmental Neuroscience* 22 (1-2): 86-95.
- Gensburger, C., Labourdette, G. und Sensenbrenner, M. (1987). "Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro." *FEBS letters* 217 (1): 1-5.
- Ghosh, A. und Greenberg, M. E. (1995). "Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis." *Neuron* 15 (1): 89-103.

Gregory, C. A., Ylostalo, J. und Prockop, D. J. (2005). "Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate." *Sci. STKE* (294): pe37.

Grimm, P. C., Nickerson, P. et al. (2001). "Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection." *N. Engl. J. Med.* 345 (2): 93-97.

Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P. et al. (1999). "Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain." *J. Neurosci.* 19 (9): 3287-3297.

Gritti, A., Parati, E. A. et al. (1996). "Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor." *J. Neurosci.* 16: 1091-1100.

Gritti, A., Cova, L. et al. (1995). "Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS." *Neurosci. Lett.* 185 (3): 151-154.

Gronthos, S., Zannettino A. C. W. et al. (2003). "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 9): 1827-1835.

Gronthos, S., Simmons, P. J. et al. (2001). "Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix." *Bone* 28 (2): 174-181.

Gronthos, S. und Simmons, P. J. (1995). "The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro." *Blood* 85 (4): 929-940.

Grove, J. E., Bruscia, E. et al. (2004). "Plasticity of bone marrow-derived stem cells." *Stem Cells* 22 (4): 487-500.

Grove, J. E., Lutzko, C. et al. (2002). "Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium." *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27 (6): 645-651.

Guo, L., Yin, F. et al. (2005). "Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro." *Biomed. Environ. Sci.* 18 (1): 36-42.

Gupta, S., Verfaillie, C. et al. (2002). "A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure." *Kidney International* 62 (4): 1285-1290.

Gussoni, E., Bennett, R. R. et al. (2002). "Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation." *J Clin. Invest.* 110 (6): 807-814.

Gussoni, E., Soneoka, Y. et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." *Nature* 401 (6751): 390-394.

- Habisch, H.-J., Janowski, M. et al. (2007). "Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects." *Journal of Neural Transmission* 114 (11): 1395-1406.
- Hainfellner, J. A., Voightländer, T. et al. (2001). "Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo." *Journal of Neuropathology and experimental Neurology* 60 (5): 449-461.
- Hajihosseini, M. K., Dickson, C. (1999). "A subset of fibroblast growth factors (Fgfs) promote survival, but Fgf-8b specifically promotes astroglial differentiation of rat cortical precursor cells." *Mol. Cell. Neurosci.* 14: 468-485.
- Hall, D. E., Neugebauer K. M. et al. (1987). "Embryonic neural retinal cell response to extracellular matrix proteins: developmental changes and effects of the cell substratum attachment antibody (CSAT)." *The Journal of Cell Biology* 104 (3): 623-634.
- Hashimoto, Y., Abiru, Y. et al. (1999). "Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal 2-week-old rats." *Brain Research* 115 (1): 25-32
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A. et al. (1992a). "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." *Bone* 13 (1): 69-80.
- Haynesworth, S. E., Goshima, J. et al. (1992b). "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow." *Bone* 13 (1): 81-88.
- Hermann, A., Liebau S. et al. (2006). "Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols." *J. Neurosci. Res.* 83 (8): 1502-1514.
- Hermann, A., Gastl R. et al. (2004). "Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells." *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 19): 4411-4422.
- Herzog, E. L. und Krause, D. S. (2006). "Engraftment of marrow-derived epithelial cells: the role of fusion." *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3 (8): 691-695.
- Herzog, E. L., Chai, L. und Krause, D. S. (2003). "Plasticity of marrow-derived stem cells." *Blood* 102 (10): 3483-3493.
- Hess, D. C., Hill, W. D. et al. (2004). "Do bone marrow cells generate neurons?" *Archives of Neurology* 61 (4): 483-485.
- Hess, D., Li, L. et al. (2003). "Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration." *Nature Biotechnology* 21 (7): 763-770.
- Hirose, M., Ishizaki, T. et al. (1998). "Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells." *The Journal of Cell Biology* 141 (7): 1625-1636.
- Hofstetter, C. P., Schwarz, E. J. et al. (2002). "Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 2199-2204.

- Holtzman, D. M. und Mobley, W. C. (1994). "Neurotrophic factors and neurologic disease." *The Western Journal of Medicine* 161 (3): 246-254.
- Hori, Y., Inoue, S. et al. (2004). "Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells." *Tissue Engineering* 10 (7-8): 995-1005.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L. et al. (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta implications for cell therapy of bone." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99 (13): 8932-8937.
- Horwitz, H. E., Prockop, D. J. et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." *Blood* 97 (5): 1227-1231.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J. et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nat. Med.* 5: 309-313.
- Houghton, J., C. Stoicov C. et al. (2004). "Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells." *Science* 306 (5701): 1568-1571.
- Humpherys, D., Eggan, K. et al. (2002). "Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99 (20): 12889-12894.
- Humphries, M. J., Akiyama, S. K. et al. (1988). "Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment." *The Journal of Cell Biology* 106 (4): 1289-1297.
- Hung, S.-C., Chen, N.-J. et al. (2002a). "Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow." *Stem Cells* 20: 249-258.
- Hung, S.-C., Cheng, H. et al. (2002b). "In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells." *Stem cells* 20 (6): 522-529.
- Hynes, M., Porter, J. A. et al. (1995). "Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog." *Neuron* 15 (1): 35-44.
- Iacopetti, P., Barsacchi, G. et al. (1994). "Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday." *Mechanisms of Development* 47 (2): 127-137.
- Ianus, A., Holz, G. G. et al. (2003). "In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion." *J. Clin. Invest.* 111 (6): 843-850.
- Ip, N. Y., Li, Y. et al. (1993). "Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but not NGF." *J. Neurosci.* 13 (8): 3394-3405.
- Isahara, K., Ohsawa, Y. et al. (1999). "Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases." *Neuroscience* 91 (1): 233-249.

Isele, N. B., Lee, H.-S. et al. (2007). "Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons." *Neurochemistry International* 50 (1): 243-250.

Ishizawa, K., Kubo, H. et al. (2004). "Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema." *FEBS letters* 556 (1-3): 249-252.

Iso, Y., Spees, J. L. et al. (2007). "Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (3): 700-706.

Ito, T., Suzuki, A. et al. (2001). "Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling." *Journal of the American Society of Nephrology* 12 (12): 2625-2635.

Janssens, S., Dubois, C. et al. (2006). "Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial." *The Lancet* 367 (9505): 113-121.

Javazon, E. H., Colter, D. C. et al. (2001). "Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells." *Stem cells* 19 (3): 219-225.

Jiang, Y., Henderson, D. et al. (2003). "Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (Suppl 1): 11854-11860.

Jiang, Y., Jahagirdar, B. N. et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* 418: 41-49.

Jin, H. K., Carter, J. E. et al. (2002). "Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span." *J. Clin. Invest.* 109 (9): 1183-91.

Jin, K., Mao, X. O. et al. (2003a). "Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression." *Experimental Neurology* 184 (1): 78-89.

Jin, K., Sun, Y. et al. (2003b). "Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice." *Aging cell* 2(3): 175-183.

Joannides, A., Gaughwin, P. et al. (2004). "Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells." *The Lancet* 364 (9429): 172-178.

Joannides, A., Gaughwin, P. et al. (2003). "Postnatal astrocytes promote neural induction from adult human bone marrow-derived stem cells." *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12 (6): 681-688.

- Johansson, C. B., Momma, S. et al. (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." *Cell* 96 (1): 25-34.
- Johe, K. K., Hazel, T. G. et al. (1996). "Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system." *Genes & Development* 10 (24): 3129-3140.
- Jouhilahti, E.-M., Peltonen, S. et al. (2008). "Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types." *J. Histochem. Cytochem.* 56(12): 1113-1119.
- Joyner, C. J., Bennett, A. et al. (1997). "Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies." *Bone* 21 (1): 1-6.
- Jukkola, T., Lahti, L. et al. (2006). "FGF regulated gene-expression and neuronal differentiation in the developing midbrain-hindbrain region." *Developmental Biology* 297 (1): 141-157.
- Kabos, P., Ehteshami, M. et al. (2002). "Generation of Neural Progenitor Cells from Whole Adult Bone Marrow." *Experimental Neurology* 178 (2): 288-293.
- Kale, S., Karihaloo, A. et al. (2003). "Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule." *J. Clin. Invest.* 112 (1): 42-49.
- Kam, L., Shain, W. et al. (2001). "Axonal outgrowth of hippocampal neurons on micro-scale networks of polylysine-conjugated laminin." *Biomaterials* 22 (10): 1049-1054.
- Kan, I., Ben-Zur, T. et al. (2007). "Dopaminergic differentiation of human mesenchymal stem cells--utilization of bioassay for tyrosine hydroxylase expression." *Neurosci. Lett.* 419 (1): 28-33.
- Kang, H. und Schuman, E. M. (1996). "A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity." *Science* 273 (5280): 1402-1406.
- Kang, H. und Schuman, E. M. (1995). "Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus." *Journal of Physiology Paris* 89 (1): 11-22.
- Kato, A. C. und Lindsay, R. M. (1994). "Overlapping and additive effects of neurotrophins and CNTF on cultured human spinal cord neurons." *Experimental Neurology* 130 (2): 196-201.
- Katsetos, C. D., Herman, M. M. et al. (2003). "Class III beta-tubulin in human development and cancer." *Cell motility and the cytoskeleton* 55 (2): 77-96.
- Kaufman, L. M. und Barrett, J. N. (1983). "Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture." *Science* 220 (4604): 1394-1396.
- Kawaja, M. D. und Gage, F. H. (1992). "Morphological and neurochemical features of cultured primary skin fibroblasts of Fischer 344 rats following striatal implantation." *Journal Comp. Neurol.* 317 (1): 102-116.

- Kawasaki, H., Mizuseki, K. et al. (2000). "Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity." *Neuron* 28 (1): 31-40.
- Kern, S., Eichler, H. et al. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." *Stem Cells* 24 (5): 1294-1301.
- Kilpatrick, T. J. und Bartlett, P. F. (1995). "Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF." *J. Neurosci.* 15 (5 Pt 1): 3653-3661.
- Kilpatrick, T. J. und Bartlett, P. F. (1993). "Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation." *Neuron* 10 (2): 255-265.
- Kim, B. J., Seo, J. H. et al. (2002). "Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro." *Neuroreport* 13 (9): 1185-1188.
- Kim, T. E., Lee, H. S. et al. (2003). "Sonic hedgehog and FGF8 collaborate to induce dopaminergic phenotypes in the Nurr1-overexpressing neural stem cell." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (4): 1040-1048.
- Kleeberger, W., Versmold, A. et al. (2003). "Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury." *The American Journal of Pathology* 162 (5): 1487-1494.
- Kleeberger, W., Rothämel, T. et al. (2002). "High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis." *Hepatology* 35 (1): 110-116.
- Klein, T., Ling, Z. et al. (2003). "Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas." *J. Histochem. Cytochem.* 51 (6): 697-706.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L. et al. (1986). "Basement membrane complexes with biological activity." *Biochemistry* 25 (2): 312-318.
- Koç, O. C., Day, J. et al. (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." *Bone Marrow Transplant* 30 (4): 215-222.
- Koç, O. N., Gerson, S. L. et al. (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J. Clin. Oncol.* 18 (2): 307-316.
- Kohyama, J., Abe, H. et al. (2001). "Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent." *Differentiation* 68 (4-5): 235-244.
- Kojima, M., Klein, R. L. et al. (2002). "Pre- and post-synaptic modification by neurotrophins." *Neurosci. Res.* 43 (3): 193-199.

- Koller, M. R., Maher, R. J. et al. (1998). "Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expansion: human serum and serum-free media." *Journal of Hematotherapy* 7 (5): 413-423.
- Komarova, S., Kawakami, Y. et al. (2006). "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses." *Molecular cancer therapeutics* 5 (3): 755-766.
- Kondo, T., Johnson, S. A. et al. (2005). "Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 (13): 4789-4794.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. und Phinney, D. G. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96 (19): 10711-10716.
- Körbling, M., Katz, R. L. et al. (2002). "Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells." *N. Engl. J. Med.* 346 (10): 738-746.
- Korhonen, M. (2007). "Culture of human mesenchymal stem cells in serum-free conditions: no breakthroughs yet." *European Journal of Haematology* 78 (2): 167-167.
- Kotton, D. N., Ma, B. Y. et al. (2001). "Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium." *Development* 128 (24): 5181-5188.
- Krause, D. S., Theise, N. D., et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." *Cell* 105 (3): 369-377.
- Kuçi, S., Wessels, J. T. et al. (2003). "Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells." *Blood* 101 (3): 869-876.
- Kuehnle, I. und Goodell, M. A. (2002). "The therapeutic potential of stem cells from adults." *BMJ* 325 (7360): 372-376.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., et al. (1997). "Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain." *J. Neurosci.* 17 (15): 5820-5829.
- Kunter, U., Rong, S. et al. (2006). "Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis." *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 (8): 2202-2212.
- Kurozumi, K., Nakamura, K. et al. (2004). "BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model." *Molecular therapy* 9 (2): 189-197.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H. und Robey, P. G. (2000). "Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation." *Transplantation* 70 (12): 1780-1787.

Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H. et al. (1997). "Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo." *J. Bone Miner. Res.* 12 (9): 1335-1347.

LaBarge, M. A. und Blau H. M. (2002). "Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury." *Cell* 111 (4): 589-601.

Laferrière, N. B., MacRae, T. H. und Brown, D. L. (1997). "Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons." *Biochem. Cell Biology* 75 (2): 103-117.

Lagasse, E., Connors, H. et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." *Nature Medicine* 6 (11): 1229-1234.

Lamoury, F. M. J., Croitoru-Lamoury, J. und Brew, B. J. (2006). "Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1." *Cytotherapy* 8 (3): 228-242.

Lazarus, H. M., Koc, O. N. et al. (2005). "Cotransplantation of HLA-Identical Sibling Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells and Hematopoietic Stem Cells in hematologic malignancy patients." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11 (5): 389-398.

Lärkfors, L., Lindsay, R. M. und Alderson, R. F. (1996). "Characterization of the responses of Purkinje cells to neurotrophin treatment." *Journal of Neurochemistry* 66(4): 1362-1373.

Le Blanc, K., Frassoni, F. et al. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." *The Lancet* 371 (9624): 1579-1586.

Le Blanc, K. und Ringdén O. (2007). "Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience." *Journal of Internal Medicine* 262 (5): 509-525.

Le Blanc, K., Tammik, L. et al. (2003a). "Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex." *Scand. J. Immunol.* 57 (1): 11-20.

Le Blanc, K., Tammik, C. et al. (2003b). "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells." *Experimental Hematology* 31 (10): 890-896.

Le Blanc, A., Liu, H. et al. (1999). "Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease." *The Journal of biological Chemistry* 274 (33): 23426-23436.

Lee, J., Kuroda, S. et al. (2003). "Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice." *Neuropathology* 23 (3): 169-180.

Lee, M. K., Rebhun, L. I. und Frankfurter, A. (1990). "Posttranslational modification of class III beta-tubulin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (18): 7195-7199.

Lee, R. H., Seo, M. J. et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (46): 17438-17443.

Lee, S. H., Lumelsky, N. et al. (2000). "Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells." *Nature Biotechnology* 18 (6): 675-679.

Lei, Z., Yongda, L. et al. (2007). "Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro." *Cell Biology International* 31 (9): 916-923.

Lein, P. J. und Higgins, D. (1989). "Laminin and a basement membrane extract have different effects on axonal and dendritic outgrowth from embryonic rat sympathetic neurons in vitro." *Developmental Biology* 136 (2): 330-345.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B. und McKay, R D (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." *Cell* 60 (4): 585-595.

Lennon, D. P. und Caplan, A. I. (2006). "Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells." *Experimental Hematology* 34 (11): 1604-1605.

Lescaudron, L., Unni, D. und Dunbar, G. L. (2003). "Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of huntington's disease: behavioral and morphological outcomes." *Int. J. Neurosci.* 113 (7): 945-956.

Letchford, J., Cardwell, A. M. et al. (2006). "Isolation of C15: A novel antibody generated by phage display against mesenchymal stem cell-enriched fractions of adult human marrow." *Journal of Immunological Methods* 308 (1): 124-137.

Levenstein, M. E., Ludwig, T. E. et al. (2006). "Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal." *Stem Cells* 24 (3): 568-574.

Levy, Y. S., Bahat-Stroomza, M. et al. (2008). "Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease." *Cytotherapy* 10 (4): 340-352.

Levy, Y. S., Stroomza, M. et al. (2004). "Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease." *Journal of molecular Neuroscience* 24 (3): 353-386.

Levy, Y. S., Merims, D. et al. (2003). "Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells." *Journal of molecular neuroscience* 21 (2): 121-132.

Lewin, G. R. und Barde, Y. A. (1996). "Physiology of the neurotrophins." *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 289-317.

Li, Y., Chen, J. et al. (2001a). "Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." *Neurosci. Lett.* 316 (2): 67-70.

Li, Y., Chen, J. et al. (2001b). "Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells" *Neurology* 56 (12): 1666-1672.

- Lillien, L. und H. Raphael, H. (2000). "BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells." *Development* 127 (22): 4993-5005.
- Lindholm, D., Carroll, P. et al. (1996). "Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4." *Eur. J. Neurosci.* 8 (7): 1452-1460.
- Lindsay, R. M., Thoenen, H. und Barde, Y A. (1985). "Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor." *Developmental Biology* 112 (2): 319-328.
- Ling, Z. D., Potter, E. D. et al. (1998). "Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines." *Experimental Neurology* 149 (2): 411-423.
- Liu, T. M., Martina, M. et al. (2007). "Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages." *Stem Cells* 25 (3): 750-760.
- Liu, X. und Zhu, X. Z. (1999). "Roles of p53, c-Myc, Bcl-2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis: a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor." *Neuroreport* 10 (14): 3087-3091.
- Liu, Z., Li, Y. et al. (2008). "Contralesional axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment." *Stroke* 39 (9): 2571-2577.
- Locatelli, F., Corti, S. et al. (2003). "Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells." *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12 (6): 727-734.
- Long, X., Olszewski, M. et al. (2005). "Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells." *Stem Cells and Development* 14 (1): 65-69.
- Longhi, L., Zanier, E. R. et al. (2005). "Stem cell transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury." *Transplant Immunology* 15 (2): 143-148.
- Lu, D., Mahmood, A. et al. (2001). "Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome." *Neuroreport* 12 (3): 559-563.
- Lu, L., Zhao, C. et al. (2005). "Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease." *Brain Research Protocols* 15 (1): 46-51.
- Lu, P., Blesch, A. und Tuszynski, Mark H. (2004). "Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact?" *J. Neurosci. Res.* 77 (2): 174-191.
- Luckenbill-Edds, L. (1997). "Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth." *Brain research. Brain Research Reviews* 23 (1-2): 1-27.
- Lunde, K., Solheim, S. et al. (2005). "Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects." *Scandinavian cardiovascular Journal* 39 (3): 150-158.

- Magaki, T., Kurisu, K. und Okazaki, T. (2005). "Generation of bone marrow-derived neural cells in serum-free monolayer culture." *Neurosci. Lett.* 384 (3): 282-287.
- Mahmood, A., Lu, D., et al. (2001a). "Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats." *J. Neurosurg.* 94 (4): 589-595.
- Mahmood, A., D. Lu, et al. (2001b). "Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells." *Neurosurgery* 49 (5): 1196-204.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L. et al. (1990). "Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF." *Science* 247 (4949 Pt 1): 1446-1451.
- Maitra, B., Szekely, E. et al. (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." *Bone Marrow Transplant* 33 (6): 597-604.
- Makino, S., Fukuda, K. et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." *J. Clin. Invest.* 103 (5): 697-705.
- Maness, L. M., Kestin, A. J. et al. (1994). "The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 18 (1): 143-159.
- Mannello, F. und Tonti, G. A. (2007). "Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!" *Stem Cells* 25 (7): 1603-1609.
- Mareschi, K., Novara, M. et al. (2006). "Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types." *Experimental Hematology* 34 (11): 1563-1572.
- Maric, D., Maric, I., et al. (2003). "Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation." *J. Neurosci.* 23 (1): 240-251.
- Marty, S., Wehrlé, R. und Sotelo, C. (2000). "Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus." *J. Neurosci.* 20 (21): 8087-8095.
- Massengale, M., Wagers, A. J. et al. (2005). "Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain." *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10): 1579-1589.
- Mayer, E., Dunnett, S. B. und Fawcett, J W. (1993). "Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurone precursors." *Brain research. Developmental brain research* 72 (2): 253-258.
- Mazzini, L., Mareschi, K. et al. (2008). "Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* 265 (1): 78-83.

- Mazzini, L., Mareschi, K. et al. (2006). "Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurological Research* 28 (5): 523-526.
- McAllister, A. K., Katz, L. C. und Lo, D. C. (1997). "Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth." *Neuron* 18 (5): 767-778.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* 276 (5309): 66-71.
- Mets, T. und Verdonk, G. (1981). "In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells." *Mechanisms of ageing and Development* 16 (1): 81-89.
- Meuleman, N., Tondreau, T. et al. (2006). "Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium." *European Journal of Haematology* 76 (4): 309-316.
- Mezey, E., Key, S. et al. (2003). "Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100 (3): 1364-1369.
- Mezey, E. und Chandross, K. J. (2000). "Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system." *European Journal of Pharmacology* 405: 297-302.
- Minguell, J. J. und Erices, A. (2006). "Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease." *Experimental Biology and Medicine* 231 (1): 39-49.
- Minguell, J. J., F. A. Fierro, et al. (2005). "Nonstimulated human uncommitted mesenchymal stem cells express cell markers of mesenchymal and neural lineages." *Stem Cells and Development* 14 (4): 408-414.
- Minguell, J. J., A. Erices und Conget, P. (2001). "Mesenchymal stem cells." *Experimental Biology and Medicine* 226 (6): 507-520.
- Mitalipov, S., Clepper, L. et al. (2007). "Methylation status of imprinting centers for H19/IGF2 and SNURF/SNRPN in primate embryonic stem cells." *Stem Cells* 25 (3): 581-588.
- Mokrá, J. und Nemecek, S. (1998). "Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells." *Folia biologica* 44 (5): 155-161.
- Morshead, C. M., Reynolds, B. A. et al. (1994). "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells." *Neuron* 13 (5): 1071-1082.
- Mujtaba, T., Piper, D. R. et al. (1999). "Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells." *Developmental Biology* 214 (1): 113-127.
- Müller, I., Kordowich, S. et al. (2006). "Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM." *Cytherapy* 8 (5): 437-444.

Muñoz-Elias, G., Marcus, A. J. et al. (2004). "Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival." *J. Neurosci.* 24 (19): 4585-4595.

Muñoz-Elías, G., Woodbury, D. und Black, I. B. (2003). "Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions." *Stem Cells* 21 (4): 437-448.

Muraglia, A., Cancedda, R. und Quarto, R. (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 7): 1161-1166.

Murphy, J. M., Dixon, K. et al. (2002). "Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis." *Arthritis and Rheumatism* 46 (3): 704-713.

Murphy, M., Drago, J. und Bartlett, P. F. (1990). "Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro." *J. Neurosci. Res.* 2 (4): 463-475.

Nakano, K., Migita, M. et al. (2001). "Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain." *Transplantation* 71 (12): 1735-1740.

Neuhuber, B., Gallo, G. et al. (2004). "Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype." *J. Neurosci. Res.* 77 (2): 192-204.

Ng, F., Boucher, S. et al. (2008). "PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages." *Blood* 112 (2): 295-307.

Nishino, H., Hida, H. et al. (2000). "Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum." *Experimental Neurology* 164 (1): 209-214.

Ockel, M., Lewin, G. R. und Barde, Y. A. (1996a). "In vivo effects of neurotrophin-3 during sensory neurogenesis." *Development* 122 (1): 301-307.

Ockel, M., von Schack, D. et al. (1996b). "Roles of neurotrophin-3 during early development of the peripheral nervous system." *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351 (1338): 383-387.

Offen, D., Barhum, Y. et al. (2007). "Intrastriatal transplantation of mouse bone marrow-derived stem cells improves motor behavior in a mouse model of Parkinson's disease." *Journal of neural transmission. Supplementum* (72): 133-143.

Oh, S.-H., Miyazaki, M. et al. (2000). "Hepatocyte Growth Factor Induces Differentiation of Adult Rat Bone Marrow Cells into a Hepatocyte Lineage in Vitro." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2): 500-504.

- Oh, S.-H., Muzzonigro, T. M. et al. (2004). "Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes." *Lab. Invest.* 84 (5): 607-617.
- Ohgushi, H., Kitamura, S. et al. (2004). "Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair." *Yonsei Medical Journal* 45 (Suppl): 61-67.
- Ojima, K., Uezumi, A. et al. (2004). "Mac-1(low) early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into injured skeletal muscle and participate in muscle regeneration." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (4): 1050-1061.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K. et al. (1996). "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro." *Mechanisms of Development* 59 (1): 89-102.
- Okamoto, R., Yajima, T. et al. (2002). "Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract." *Nature Medicine* 8 (9): 1011-1017.
- Olanow, C. W., Goetz, C. G. et al. (2003). "A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 54 (3): 403-414.
- Oliver, L. J., Rifkin, D. B. et al. (1990). "Long-term culture of human bone marrow stromal cells in the presence of basic fibroblast growth factor." *Growth factors* 3 (3): 231-236.
- Ono, K., Yoshihara, K. et al. (2003). "Preservation of hematopoietic properties in transplanted bone marrow cells in the brain." *J. Neurosci. Res.* 72 (4): 503-507.
- Oreffo, R. O., Bord, S. und Triffitt, J. T. (1998). "Skeletal progenitor cells and ageing human populations." *Clinical Science* 94 (5): 549-555.
- Orlic, D., Kajstura, J., et al. (2001a). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." *Nature* 410 (6829): 701-705.
- Orlic, D., Kajstura, J. et al. (2001b). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (18): 10344-10349.
- Ornitz, D. M. und N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." *Genome biology* 2 (3): reviews3005.1- reviews3005.12.
- Ortiz, L. A., Gambelli, F. et al. (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (14): 8407-8411.
- Owen, M. (1988). "Marrow stromal cells." *J. Cell Sci. Suppl.* 10: 63-76.
- Pacary, E., Legros, H. et al. (2006). "Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 13): 2667-2678.
- Padovan, C. S., Jahn, K., et al. (2003). "Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells." *Cell. Transplant.* 12 (8): 839-848.

- Palmer, T. D., Markakis, E. A., et al. (1999). "Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS." *J. Neurosci.* 19 (19): 8487-8497.
- Palmer, T. D., Ray, J. und Gage, F. H. (1995). "FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain." *Mol. Cell. Neurosci.* 6 (5): 474-486.
- Pappas, I. S. und Parnavelas, J. G. (1997). "Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex." *Experimental Neurology* 144 (2): 302-314.
- Parr, A. M., Tator, C. H. und Keating, A. (2007). "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury." *Bone Marrow Transplantation* 40 (7): 609-619.
- Pereboeva, L., Komarova, S. et al. (2003). "Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles." *Stem Cells* 21 (4): 389-404.
- Perin, E. C., Dohmann, H. F. R. et al. (2004). "Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy." *Circulation* 110 (11 Suppl. 1): II213-218.
- Perrone-Capano, C. und Di Porzio, U. (2000). "Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development." *The International Journal of Developmental Biology* 44 (6): 679-687.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C. et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* 284 (5417): 1168-1170.
- Phinney, D. G. und Prockop, D. J. (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." *Stem Cells* 25 (11): 2896-2902.
- Phinney, D. G., Kopen, G. et al. (1999). "Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 75 (3): 424-436.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M. et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284 (5411): 143-147.
- Pochampally, R. R., Smith, J. R. et al. (2004). "Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes." *Blood* 103 (5): 1647-1652.
- Potten, C. S. und Loeffler, M. (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." *Development* 110 (4): 1001-1020.
- Poulsom, R., Forbes, S. J. et al. (2001). "Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration." *The Journal of Pathology* 195 (2): 229-235.

- Powell, P. P., Finklestein, S. P. et al. (1991). "Temporal, differential and regional expression of mRNA for basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat brain." *Brain research. Molecular Brain Research* 11 (1): 71-77.
- Priller, J., Persons, D. A. et al. (2001). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." *The Journal of Cell Biology* 155 (5): 733-738.
- Prockop, D. J., Gregory, C. A. und Spees, J. L. (2003). "One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100 (Suppl 1): 11917-11923.
- Prockop, D. J. (2004). "Targeting gene therapy for osteogenesis imperfecta." *N. Engl. J. Med.* 350 (22): 2302-2304.
- Prockop, D. J. (2007). "'Stemness' does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 82 (3): 241-243.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stroma cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." *Science* 276 (5309): 71-74.
- Prodromidi, E. I., Poulosom, R. et al. (2006). "Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome." *Stem Cells* 24 (11): 2448-2455.
- Qian, H., Yang, H. et al. (2008). "Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells." *International Journal of Molecular Medicine* 22 (3): 325-332.
- Qian, L. und Saltzman, W. M. (2004). "Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification." *Biomaterials* 25 (7): 1331-1337.
- Quaini, F., Urbanek, K. et al. (2002). "Chimerism of the transplanted heart." *N. Engl. J. Med.* 346 (1): 5-15.
- Quinn, S. M., Walters, W. M. et al. (1999). "Lineage restriction of neuroepithelial precursor cells from fetal human spinal cord." *J. Neurosci. Res.* 57 (5): 590-602.
- Raballo, R., Rhee, J. et al. (2000). "Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex." *J. Neurosci.* 20 (13): 5012-5023.
- Raedt, R., Pinxteren, J. et al. (2007). "Differentiation assays of bone marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cell (MAPC)-like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers." *Experimental Neurology* 203 (2): 542-554.
- Rao, M. S. (1999). "Multipotent and restricted precursors in the central nervous system." *The Anatomical Record* 257 (4): 137-148.

- Ray, J., Peterson, D. A., Schinstine, M., Gage, F. H. (1993). "Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (8): 3602-3606.
- Reik, W., Dean, W. und Walter, J. (2001). "Epigenetic reprogramming in mammalian development." *Science* 293 (5532): 1089-1093.
- Reyes, M., Li, S. et al. (2005). "Donor origin of multipotent adult progenitor cells in radiation chimeras." *Blood* 106 (10): 3646-3649.
- Reyes, M., Lund, T. et al. (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells." *Blood* 98 (9): 2615-2625.
(2009 wird die Publikation aufgrund zahlreicher Irregularitäten in Text und Figuren zurückgezogen: *Blood*. (2009) 113 (10): 2370)
- Reyes, M. und Verfaillie, C. M. (2001). "Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 938: 231-233.
- Reynolds, B. A. und Weiss, S. (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255 (5052): 1707-1710.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W. und Weiss, S. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." *J. Neurosci.* 12 (11): 4565-4574.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J. und Bartlett, P. F. (1992). "De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (18): 8591-8595.
- Rickard, D. J., Kassem, M. et al. (1996). "Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow." *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (3): 312-324.
- Riess, P., Molcanyi, M. et al. (2007). "Embryonic stem cell transplantation after experimental traumatic brain injury dramatically improves neurological outcome, but may cause tumors." *Journal of Neurotrauma* 24 (1): 216-225.
- Ringdén, O., Uzunel, M. et al. (2006). "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." *Transplantation* 81 (10): 1390-1397.
- Ripa, R. S., Haack-Sørensen, M. et al. (2007). "Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial." *Circulation* 116 (11 Suppl): I-24-I-30.
- Rismanchi, N., Floyd, C. L. et al. (2003). "Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols." *Brain Research* 991 (1): 46-55.

- Rivera, F. J., Sierralta, W. D. et al. (2006). "Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells." *Neurosci. Lett.* 406 (1-2): 49-54.
- Rogers, S. L., Letourneau, P. C. und Pech, I. V. (1989). "The role of fibronectin in neural development." *Developmental Neuroscience* 11 (4-5): 248-265.
- Rogers, S. L., Letourneau, P. C. et al. (1987). "Selective interaction of peripheral and central nervous system cells with two distinct cell-binding domains of fibronectin." *The Journal of Cell Biology* 105 (3): 1435-1442.
- Roghani, M., Mansukhani, A. et al. (1994). "Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding." *J. Biol. Chem.* 269 (6): 3976-3984.
- Rosenthal, N. (2003). "Prometheus's vulture and the stem-cell promise." *N. Engl. J. Med.* 349 (3): 267-274.
- Ross, J. J. und Verfaillie, C. M. (2008). "Evaluation of neural plasticity in adult stem cells." *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363 (1489): 199-205.
- Rosso, F., Giordano, A. et al. (2004). "From cell-ECM interactions to tissue engineering." *Journal of Cellular Physiology* 199 (2): 174-180.
- Rubio, D., Garcia, S. et al. (2008). "Molecular Characterization of Spontaneous Mesenchymal Stem Cell Transformation." *PLoS ONE* 3(1): e1398.
- Ryan, J. M., Barry, F. P. et al. (2005). "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection." *Journal of inflammation* 2: 8.
- Sainio, K., Nonclercq, D. et al. (1994). "Neuronal characteristics in embryonic renal stroma." *The International Journal of Developmental Biology* 38 (1): 77-84.
- Sánchez-Pernaute, R., Studer, L. et al. (2001). "In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons." *J. Neurosci. Res.* 65 (4): 284-288.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., et al. (2000). "Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro." *Exp. Neurol.* 164 (2): 247-256.
- Sapienza, C. (2002). "Imprinted gene expression, transplantation medicine, and the "other" human embryonic stem cell." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (16): 10243-10245.
- Sasaki, M., Honmou, O. et al. (2001). "Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons." *Glia* 35 (1): 26-34.
- Satake, K., Lou, J. und Lenke, L. G. (2004). "Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue." *Spine* 29 (18): 1971-1979.
- Schächinger, V., Erbs, S. et al. (2006). "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial." *European Heart Journal* 27 (23): 2775-2783.

- Schecroun, N. und Delloye, C. (2004). "In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma." *Bone* 35 (2): 517-524.
- Schuldiner, M., Yanuka, O. et al. (2000). "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (21): 11307-11312.
- Scintu, F., Reali, C. et al. (2006). "Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments." *BMC Neuroscience* 7: 14.
- Seeger, F. H., Tonn, T. et al. (2007). "Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction." *European Heart Journal* 28 (6): 766-772.
- Sekiya, I., Larson, B. L. et al. (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality." *Stem Cells* 20 (6): 530-541.
- Seshi, B., Kumar, S. und King, D. (2003). "Multilineage gene expression in human bone marrow stromal cells as evidenced by single-cell microarray analysis." *Blood Cells Mol. Dis.* 31 (2): 268-285.
- Shetty, A. K. und Turner, D. A. (1998). "In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor." *Journal of Neurobiology* 35 (4): 395-425.
- Shigeno, Y. und Ashton, B. A. (1995). "Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age." *The Journal of Bone and Joint Surgery* 77 (1): 139-142.
- Shihabuddin, L. S., Ray, J. und Gage, F. H. (1997). "FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord." *Experimental Neurology* 148 (2): 577-586.
- Shiota, M., Heike, T. et al. (2007). "Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties." *Experimental cell research* 313 (5): 1008-1023.
- Simmons, P. J. und Torok-Storb, B. (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." *Blood* 78(1): 55-62 UR -
- Slavin, S., Kurkalli, B. G. S. und Karussis, D. (2008). "The potential use of adult stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurodegenerative disorders." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 110 (9): 943-946.
- Smalheiser, N. R. (1991). "Role of laminin in stimulating rapid-onset neurites in NG108-15 cells: relative contribution of attachment and motility responses." *Brain research. Developmental Brain Research* 62 (1): 81-89.
- Snider, W. D. (1994). "Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us." *Cell* 77 (5): 627-638.

Sonabend, A. M., Ulasov, I. V. et al. (2008). "Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma." *Stem Cells* 26 (3): 831-841.

Song, H.-J., Stevens, C. F. und Gage, F. H. (2002b). "Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons." *Nature Neuroscience* 5 (5): 438-445.

Song, S., Song, S. et al. (2007). "Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells." *Stem Cells and Development* 16 (5): 747-756.

Sostak, P., Theil, D., Stepp, H., Roeber, S., Kretzschmar, H. A., Straube, A. (2007). "Detection of bone marrow-derived cells expressing a neural phenotype in the human brain." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (2): 110-6.

Spees, J. L., Gregory, C. A. et al. (2004). "Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy." *Molecular Therapy* 9 (5): 747-756.

Spencer, H., Rampling, D. et al. (2005). "Transbronchial biopsies provide longitudinal evidence for epithelial chimerism in children following sex mismatched lung transplantation." *Thorax* 60 (1): 60-62.

Spyridonidis, A., Schmitt-Gräff, A. et al. (2004). "Epithelial tissue chimerism after human hematopoietic cell transplantation is a real phenomenon." *The American Journal of Pathology* 164 (4): 1147-1155.

Stamm, C., Kleine, H.-D. et al. (2007). "Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 133 (3): 717-725.

Stamm, C., Westphal, B. et al. (2003). "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration." *The Lancet* 361 (9351): 45-46.

"Stem Cell Basics". In: *Stem Cell Information* [URL]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services (2009).

Online: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage> (Stand 15.05.2010)

Stewart, K., Walsh, S. et al. (1999). "Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells." *Journal of bone and mineral research* 14 (8): 1345-1356.

Strauer, B. E., Brehm, M. et al. (2005). "Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study." *Journal of the American College of Cardiology* 46 (9): 1651-1658.

Strauer, B. E., Brehm, M. et al. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." *Circulation* 106 (15): 1913-1918.

- Studer, L., Csete, M. et al. (2000). "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen." *J. Neurosci.* 20 (19): 7377-7383.
- Studer, L., Tabar, V. und McKay, R. D. (1998). "Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats." *Nature Neuroscience* 1 (4): 290-295.
- Stull, N. D. und Iacovitti, L. (2001). "Sonic hedgehog and FGF8: inadequate signals for the differentiation of a dopamine phenotype in mouse and human neurons in culture." *Experimental Neurology* 169 (1): 36-43.
- Stute, N., Holtz, K. et al. (2004). "Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use." *Experimental Hematology* 32 (12): 1212-1225.
- Suratt, B. T., Cool, C. D. et al. (2003). "Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (3): 318-322.
- Svendsen, C. N., Bhattacharyya, A. und Tai, Y. T. (2001). "Neurons from stem cells: preventing an identity crisis." *Nature Reviews. Neuroscience* 2 (11): 831-834.
- Svendsen, C. N., Skepper, J. et al. (1997). "Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse." *Brain research. Developmental Brain Research* 99 (2): 253-258.
- Tao, H., Rao, R. und Ma, D. D. (2005). "Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition." *Development, Growth & Differentiation* 47 (6): 423-433.
- Tatard, V. M., D'Ippolito, G. et al. (2007). "Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons." *Bone* 40 (2): 360-373.
- Theise, N. D., Henegariu, O. et al. (2002). "Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow." *Experimental Hematology* 30 (11): 1333-1338.
- Theise, N. D., Badve, S. et al. (2000). "Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation." *Hepatology* 31 (1): 235-240.
- Thiele, J., Varus, E. et al. (2004). "Regeneration of heart muscle tissue: quantification of chimeric cardiomyocytes and endothelial cells following transplantation." *Histology and Histopathology* 19 (1): 201-209.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J. et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145-1147.
- Till, J. E. und McCulloch, E. A. (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiation Research* 14: 213-222.
- Timpl, R. (1989). "Structure and biological activity of basement membrane proteins." *European Journal of Biochemistry* 180 (3): 487-502.

- Toda, H., Takahashi, J. et al. (2000). "Neurons generated from adult rat hippocampal stem cells form functional glutamatergic and GABAergic synapses in vitro." *Experimental Neurology* 165 (1): 66-76.
- Tögel, F., Lange, C. et al. (2007). "Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark." *Dtsch. Arztebl.* 104 (23): A 1663-70.
- Toma, C., Pittenger, M. F. et al. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." *Circulation* 105 (1): 93-98.
- Tondreau, T., Meuleman, N. et al. (2005). "Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity." *Stem Cells* 23 (8): 1105-1112.
- Tondreau, T., Lagneaux, L. et al. (2004a). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation." *Differentiation* 72 (7): 319-326.
- Tondreau, T., Lagneaux, L. et al. (2004b). "Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential." *Cytotherapy* 6 (4): 372-379.
- Tonti, G. und Mannello, F. (2008). "From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera?" *Int. J. Dev. Biol.* 52 (8): 1023-32.
- Tremain, N., Korkko, J. et al. (2001). "MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages." *Stem Cells* 19 (5): 408-418.
- Tropel, P., Platet, N. et al. (2006). "Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 24 (12): 2868-2876.
- Tropepe, V., Sibia, M., et al. (1999). "Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon." *Dev. Biol.* 208 (1): 166-188.
- Tsutsumi, S., Shimazu, A. et al. (2001). "Retention of Multilineage Differentiation Potential of Mesenchymal Cells during Proliferation in Response to FGF." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2): 413-419.
- Tzeng, S.-F., Tsai, M. J. et al. (2004). "Neuronal morphological change of size-sieved stem cells induced by neurotrophic stimuli." *Neurosci. Lett.* 367 (1): 23-28.
- Vaccarino, F. M., Schwartz, M. L. et al. (1999). "Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis." *Nature Neuroscience* 2 (3): 246-253.
- Vahtinen, S., Lukka, R. et al. (2001). "The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60 (6): 588-597.

Van Damme, A., Chuah, M. K. L. et al. (2003). "Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats." *Haemophilia* 9(1): 94-103.

Ventimiglia, R., Mather, P. E. et al. (1995). "The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro." *Eur. J. Neurosci.* 7 (2): 213-222.

Verfaillie, C. M., Schwartz, R. et al. (2003). "Unexpected potential of adult stem cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 996: 231-234.

Vescovi, A. L., Parati, E. A., et al. (1999). "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation." *Exp. Neurol.* 156 (1): 71-83.

Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., et al. (1993). "bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells." *Neuron* 11 (5): 951-966.

Vicario-Abejón, C. (2004). "Long-term culture of hippocampal neurons." *Curr. Protoc. Neurosci.*: Chapter 3: Unit 3.2.

Vicario-Abejón, C., Owens, D. et al. (2002). "Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization." *Nature reviews. Neuroscience* 3 (12): 965-974.

Vicario-Abejón, C., Collin, C. et al. (1998). "Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons." *J. Neurosci.* 18 (18): 7256-7271.

Vicario-Abejón, C., Johe, K. K. et al. (1995). "Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons." *Neuron* 15 (1): 105-114.

Vogel, J. P., Szalay, K. et al. (2006). "Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics." *Platelets* 17 (7): 462-469.

Vogel, W., Grünebach, F. et al. (2003). "Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells." *Haematologica* 88 (2): 126-133.

Vukicevic, S., Kleinman, H. K. et al. (1992). "Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components." *Experimental cell research* 202 (1): 1-8.

Wachs, F.-P., Couillard-Despres, S. et al. (2003). "High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells." *Laboratory Investigation* 83 (7): 949-962.

Wagers, A. J. und Weissman, I. L. (2004). "Plasticity of Adult Stem Cells." *Cell* 116 (5): 639-648.

- Wagner, J. P., Black, I. B. und DiCicco-Bloom, E. (1999a). "Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor." *J. Neurosci.* 19 (14): 6006-6016.
- Wagner, J. P., Akerud, P. et al. (1999b). "Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes." *Nature Biotechnology* 17 (7): 653-659
- Wakayama, T., Tabar, V. et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer." *Science* 292 (5517): 740-743.
- Walicke, P., Cowan, W. M. et al. (1986). "Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 (9): 3012-3016.
- Walthall, B. J. und Ham, R. G. (1981). "Multiplication of human diploid fibroblasts in a synthetic medium supplemented with EGF, insulin, and dexamethasone." *Experimental Cell Research* 134 (2): 303-311.
- Wang, G., Bunnell, B. A. et al. (2005a). "Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (1): 186-191.
- Wang, L., Li, L. et al. (2005b). "Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development." *Blood* 105 (12): 4598-4603.
- Wang, L., Li, Y. et al. (2002). "Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture." *Experimental Hematology* 30 (7): 831-836.
- Wang, M. Z., Jin, P. et al. (1995). "Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein." *Nature Medicine* 1 (11): 1184-1188.
- Wang, Q. R., Yan, Z. J. und Wolf, N. S. (1990). "Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F." *Experimental Hematology* 18 (4): 341-347.
- Watt, F. M. und Hogan, B. L. (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." *Science* 287 (5457): 1427-1430.
- Wehner, T., Böntert, M. et al. (2003). "Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo." *J. Neurosci.* 23 (12): 5004-5011.
- Weimann, J. M., Charlton, C. A. et al. (2003a). "Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (4): 2088-2093.
- Weimann, J. M., Johansson, C. B. et al. (2003b). "Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant." *Nat. Cell Biol.* 5 (11): 959-966.

Weiss, S., Dunne, C. et al. (1996). "Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis." *J. Neurosci.* 16 (23): 7599-7609.

Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." *Cell* 100 (1): 157-168.

Whittemore, S. R., Morassutti, D. J. et al. (1999). "Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations." *Experimental Cell Research* 252 (1): 75-95.

Wislet-Gendebien, S., Hans, G. et al. (2005). "Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype." *Stem Cells* 23 (3): 392-402.

Wislet-Gendebien, S., Bruyère, F. et al. (2004). "Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4." *BMC Neuroscience* 5: 33.

Wislet-Gendebien, S., Leprince, P. et al. (2003). "Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 16): 3295-3302.

Wollert, K. C., Meyer, G. P. et al. (2004). "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial." *The Lancet* 364 (9429): 141-148.

Woodbury, D., Reynolds, K. und Black, I. B. (2002). "Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis." *J Neurosci. Res.* 69 (6): 908-917.

Woodbury, D., Schwarz, E. J., et al. (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." *J. Neurosci. Res.* 61: 364-370.

Wright, L. S., Prowse, K. R. et al. (2006). "Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro." *Experimental Cell Research* 312 (11): 2107-2120.

Xu, C., Rosler, E. et al. (2005b). "Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium." *Stem Cells* 23(3): 315-323.

Xu, C., Inokuma, M. S. et al. (2001). "Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells." *Nature Biotechnology* 19 (10): 971-974.

Xu, R.-H., Peck, R. M. et al. (2005a). "Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells." *Nature Methods* 2 (3): 185-190.

Yamada, M., Kubo, H. et al. (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury." *Journal of Immunology* 172 (2): 1266-1272.

Yamaguchi, M., Hirayama, F. et al. (2002). "Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion." *Transfusion* 42 (7): 921-927.

- Yamaguchi, T. P. und Rossant, J. (1995). "Fibroblast growth factors in mammalian development." *Current opinion in Genetics & Development* 5 (4): 485-491.
- Ye, W., Shimamura, K. et al. (1998). "FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate." *Cell* 93 (5): 755-766.
- Yeoh, J. S. G. und de Haan, G. (2007). "Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging." *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (1): 17-24.
- Yoon, Y., Wecker, A. et al. (2005). "Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction." *J. Clin. Invest.* 115 (2): 326-338.
- Young, H. E., Steele, T. A. et al. (1999). "Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221 (1): 63-71.
- Young, L. E., Sinclair, K. D. und Wilmut, I. (1998). "Large offspring syndrome in cattle and sheep." *Reviews of Reproduction* 3 (3): 155-163.
- Zeng, Z., Yuan, X. et al (2007). „Manipulation of proliferation and differentiation of human bone marrow-derived neural stem cells in vitro and in vivo." *J. Neurosci. Res.* 85 (2): 310-320.
- Zhang, H., Wang, J.-Z. et al. (2004). "The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation." *Chinese Journal of Traumatology* 7 (1): 3-6.
- Zhao, L. R., Duan, W. M., et al. (2002). "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." *Exp. Neurol.* 174 (1): 11-20.
- Zhao, L.-X., Zhang, J. et al. (2004). "Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection." *Experimental Neurology* 190 (2): 396-406.
- Zhu, W., Chen, J. et al. (2006). "Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 24 (2): 416-425.
- Zohlnhöfer, D., Ott, I. et al. (2006). "Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial." *JAMA* 295 (9): 1003-1010.

9. Danksagung

Prof. Dr. Andreas Straube danke ich für das herausfordernde Thema, die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe, seine Geduld und seine konstruktive Unterstützung bei der Abfassung und Abgabe der Dissertation.

Dr. Claudio Padovan danke ich für die Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten und die gute Zusammenarbeit an unserem gemeinsamen Projekt. Magdalena Petz und Dr. Petra Reich, den Mitarbeiterinnen im Labor, danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft in Rat und Tat.

Last but not least - Meinen Eltern und meiner Partnerin Claudia gilt mein besonderer Dank für ihre stete Unterstützung. Meine Eltern haben mir meinen beruflichen Werdegang erst ermöglicht.

10. Lebenslauf

Ärztlicher Werdegang

2004 - 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Prof. Dr. med. Klaus E. Unertl), Universitätsklinikum Tübingen (D)
2006 - 2008	Assistenzarzt an der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin (Dr. med. Tiziano Cassina), Cardiocentro Ticino, Lugano (CH)
seit 2009	Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie (Prof. Dr. med. Donath R. Spahn), Universitätsspital Zürich (CH)

Hochschulausbildung

1990 - 1992	Studium der Philosophie und Kath. Theologie, Universität Augsburg (D)
1992 - 1993	Studium der Kath. Theologie, Universität Fribourg (CH)
1993 - 1995	Studium der Kath. Theologie, Universität Augsburg (D)
Abschluss	Diplom
1998 - 2003	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilian-Universität München (D)
2003 - 2004	Praktisches Jahr: Cardiocentro Ticino, Lugano (CH) (Anästhesie, Intensivmedizin) Ospedale Civico, Lugano (CH) (Innere Medizin) St. James's Hospital, Dublin (IRL) (Innere Medizin) Kantonsspital Münsterlingen (CH) (Chirurgie)
Abschluss	III. Staatsexamen

Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule in Aresing (D)
1980 - 1989	Gymnasium in Dillingen a. d. Donau (D)
Abschluss	Abitur

Geburtsdatum 07.12.1970

Geburtsort Schrobenhausen (D)